

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS

Departamento de Biologia Vegetal



**Estudo das interações entre o óxido nítrico e a adenosina
que medeiam a ação da insulina no controlo da
homeostasia da glucose**

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Cristiana Raquel Soares Ferreira

Dissertação orientada por:

Orientadora Prof.^a Doutora Helena Caria

Co-orientadora Prof.^a Doutora Sílvia Conde

2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS

Departamento de Biologia Vegetal



**Estudo das interações entre o óxido nítrico e a adenosina
que medeiam a ação da insulina no controlo da
homeostasia da glucose**

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Cristiana Raquel Soares Ferreira

Dissertação orientada por:

Orientadora Prof.^a Doutora Helena Caria

Co-orientadora Prof.^a Doutora Sílvia Conde

2015

Parte dos resultados discutidos nesta tese originaram:

Uma comunicação oral num congresso internacional:

Ferreira, Cristiana R, Martins, I.B., Melo B.F., Sacramento, J.F., Guarino M.P. e Conde, S.V. (2015) *Changes in the adenosine/ nitric oxide signaling pathway are associated soleus muscle insulin resistance*. 51st European Association for the Study of Diabetes (EASD) Annual Meeting, Estocolmo, Suécia, 14-18 Setembro 2015.

Uma comunicação oral num congresso nacional:

Ferreira, Cristiana R, Sacramento, J.F., Ribeiro, M. J., Guarino M.P. e Conde, S.V. (2015) *Does adenosine modulate nitric oxide production in insulin-sensitive tissues?* XLV Reunião da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, Lisboa, 5-6 Fevereiro 2015.

Agradecimentos

Muitas vezes, no decorrer deste último ano, lembrei-me da célebre lei de Murphy - “*If anything can go wrong, it will*” e a convivência comigo nem sempre foi fácil. Agora, queria deixar uma palavra de agradecimento a todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto.

Agradeço, desde já, à Professora Doutora Sílvia Conde por me ter aceite NO seu grupo de investigação, permitindo a realização deste projeto. Agradeço, de igual forma, a confiança que em mim depositou. Agradeço-lhe também todos os conhecimentos que me transmitiu, a alegria, boa disposição e otimismo demonstrados ao longo deste ano. Aprendi que a ciência não é como a culinária, “só seguir a receita”. A ela o meu sincero muito obrigada!

Agradeço à minha orientadora interna, a Professora Doutora Maria Helena Caria, pela preocupação, disponibilidade e amabilidade que sempre teve para comigo.

Agradeço a toda farmacologia e ao grupo em que me insiro. Em especial, agradeço à Joana Sacramento o facto de me lembrar o meu nome a cada instante com “A sério Cristiana?”, a ela o meu muito obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pela preocupação e orientação. Agradeço à Bernardete pelas minhas constantes perguntas seguidas de um “Diz!”, pela sua prontidão e paciência. Agradeço também à Maria João os conselhos tão preciosos e incentivos. À Joana Coelho, Inês Martins, Sara Ragageles, Catarina Adegas e Ana Raimundo agradeço a ajuda e disponibilidade. A todas o meu muito obrigada!

Agradeço também às minhas colegas de casa e amigos pela paciência, pelos conselhos, pela força, por aturarem o meu mau humor, pelos horários, pelas ausências, pelos queixumes e porque sem eles tudo teria sido mais difícil.

Por último, gostaria de agradecer aos meus pais e irmã que sempre me apoiaram e nunca duvidaram do poder dos meus sonhos, talvez o irónico “tu é que sabes”, seguido muitas vezes dum “Eu avisei-te! Mas tu és teimosa”, tenham sido o motivo de muitas dores de cabeça para eles, mas resultou num enorme crescimento e superação a nível pessoal. Por serem quem são, um muito obrigado.

Resumo: A adenosina, é uma substância ubíqua que está envolvida no controlo de vários processos fisiológicos, entre os quais a sensibilização da ação da insulina e a homeostasia da glucose. Este mediador exerce a sua ação através da ligação a quatro diferentes tipos de recetores de adenosina: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. O óxido nítrico (NO), é o mais potente regulador da homeostasia vascular e a sua ação está positivamente relacionada com a sensibilidade à insulina. A interação entre a adenosina e o NO tem sido amplamente estudada no endotélio, e está bem estabelecido que a adenosina induz a libertação de NO via recetores A₁, A_{2A} e A_{2B} em alguns tecidos como o caso do cérebro e do coração.

O principal objetivo deste trabalho foi investigar se a adenosina modula a produção de NO nos tecidos sensíveis à insulina, como o músculo-esquelético, fígado e no tecido adiposo e se a possível alteração da interação entre adenosina e o NO pode contribuir para a insulinoresistência.

Para tal, utilizaram-se dois grupos de ratos *Wistar* de ambos os sexos: um grupo controlo, e outro submetido a uma dieta rica em sacarose (Hsu) que se obteve pela administração de 35% de sacarose na água de ingerida durante 28 dias. Após os 28 dias, os animais foram anestesiados com pentobarbital (60 mg / kg, i.p.) e o fígado, tecido adiposo e no músculo-esquelético foram dissecados e incubados durante 3 diferentes tempos 10, 30 e 60 minutos, na ausência ou na presença de várias concentrações dos seguintes agonistas dos recetores de adenosina: CPA (agonista A₁ - 3 e 30nM), CGS-21680 (agonista A_{2A} - 30 e 100nM) e BAY-60-6583 (agonistas A_{2B} - 100nM e 1μM). Após incubação os tecidos foram pesados, homogeneizados e depois desproteinizados, tendo sido o NO presente no homogeneizado quantificado.

Os valores de NO presentes no fígado após 10, 30 e 60 minutos de incubação em animais controlo (sem fármacos) foram $25,51 \pm 3,75$, $18,48 \pm 2,56$ e $12,30 \pm 1,98$, no músculo-esquelético foram $22,86 \pm 2,54$, $22,92 \pm 3,27$ e $25,79 \pm 4,41$ e no tecido adiposo foram $11,51 \pm 2,09$, $5,475 \pm 18,73$ e $16,38 \pm 2,65$ nmol / grama de tecido, respetivamente. A dieta Hsu aumentou significativamente a produção de NO no fígado em 105,60%, 275,93%, 172,5% e no músculo-esquelético, em 131,45%, 142,54%, 108,34% respetivamente após 10, 30 e 60 minutos de incubação, não afetando no entanto o tecido adiposo.

Em animais de controlo: CPA (3 nM) aumentou significativamente a produção de NO no fígado em 64,56% e 115,20% após 30 e 60 minutos de incubação e no músculo-esquelético de 79,45% após 60 minutos de incubação, não afetando o tecido adiposo; CGS-

21680 (100 nM) aumentou significativamente a produção de NO no fígado em 120,48% após 60 minutos e no tecido adiposo CGS-21680 (30nM) em 106,52% após 10 minutos de incubação; BAY-60-6583 diminuiu significativamente a produção de NO no fígado com 100nM em 59,19% e 53,16%, após 10 e 30 minutos de incubação e com 1µM em 54,62% após 30 minutos de incubação, no músculo-esquelético BAY-60-6583 (100 nM) diminuiu significativamente em 47,51%, 59,06% e 66,22%, após 10, 30 e 60 minutos de incubação e no tecido adiposo BAY-60-6583 (100 nM) diminuiu a produção de NO em 48,43% e 47,55%, após 30 e 60 minutos de incubação já com BAY-60-6583 (1µM) em 57,46% após 30 minutos de incubação.

Em animais Hsu: CPA não alterou a produção de NO em nenhum dos tecidos testados (fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo). CGS-21680 (30 e 100 nM) aumentaram significativamente a produção de NO no fígado em 55,13% e 41,06%, após 30 minutos de incubação; no músculo-esquelético, CGS-21680 (100 nM) aumentou significativamente a produção de NO em 77,91%, 119,53% e 77,28%, após 10, 30 e 60 minutos de incubação, não afetando no entanto, o tecido adiposo. BAY-60-6583 diminui a produção de NO em 39,12% no fígado, após 30 minutos de incubação, e no tecido adiposo e em 38,94%, 43 25% após 10 e 30 minutos de incubação.

Relativamente à iNOS neste estudo não se encontra alterada no modelo de dieta Hsu.

Conclui-se que a adenosina modula na produção de NO via recetores A₁ e A_{2B} no fígado e no músculo-esquelético e através dos recetores A_{2A} e A_{2B} no tecido adiposo. Em animais com resistência à insulina, há um aumento da produção de NO no fígado mediada pelo recetor adenosina A_{2A} e um aumento na produção de NO no músculo-esquelético que é abolida pelos agonistas dos recetores de adenosina do subtipo A₂.

Palavras-chave: diabetes tipo 2, adenosina, óxido nítrico, iNOS (sintase do oxido nítrico induzível), insulinoresistência

Abstract: Adenosine, is an ubiquitous substance that has an insulin-sensitizer effect on glucose homeostasis among its role in many other physiological processes. It exerts its action through the binding to four different types of adenosine receptors, A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃. Nitric oxide (NO), is the most potent regulator of vascular homeostasis, being described as positively co-related with insulin sensitivity. It is well established that adenosine induces NO release via A₁, A_{2A} and A_{2B} receptors in some tissues.

The main objective of this work was to investigate if adenosine modulates NO production in insulin sensitive tissues, like the skeletal muscle, the liver and adipose tissue and if an altered interaction between adenosine and NO is present in insulin-resistant states.

Experiments were performed in two groups of young *Wistar* rats of both sexes, one control, and the second with a high sucrose diet (Hsu) with 35% of sucrose in the water. Rats were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg, i.p) and the liver, adipose tissue and skeletal muscle were dissected and were incubated during different times (10, 30 and 60 minutes) in the absence or in the presence of several concentrations of the following adenosine agonists: BAY-60-6583 (A_{2B} agonist – 100nM and 1μM), CPA (A₁ agonist - 3 and 30nM) and CGS-21680 (A_{2A} agonist – 30 and 100nM). Tissues were weighted and homogenized and after deproteinization, NO in the homogenate was quantified in a Sievers Nitric Oxide Analyzer (NOA280i).

The values of NO present in the liver after 10, 30 and 60 minutes of incubation in control animals (no drugs) were 25.51 ± 3.75 , 18.48 ± 2.56 and 12.30 ± 1.98 , in skeletal muscle were 22.86 ± 2.54 , 22.92 ± 3.27 and 25.79 ± 4.41 and adipose tissue were 11.51 ± 2.089 , 18.73 ± 5.475 and 16.38 ± 2.645 nmol / g tissue, respectively. Hsu diet significantly increase NO production in the liver and skeletal muscle respectively by 105.60%, 275.93% and 172.5% and 131.45 %, 142.54% and 108.34% after 10, 30 and 60 minutes incubation without affecting adipose tissue.

In control animals: CPA (3nM) significantly increases NO production in liver by 64.56% and 115.20% after 30 and 60 minutes of incubation and in skeletal muscle by 79.45% after 60 minutes of incubation, without affecting the adipose tissue; CGS-21680 (100nM) significantly increase NO production in liver by 120.48% after 60 minutes and in adipose tissue CGS-21680 (30nM) by 106.52% after 10 minutes of incubation; BAY-60-6583 (100nM) significantly decrease NO production in liver by 59.19% and 53.16% after 10 and 30 minutes of incubation, and BAY-60-65831 μM by 54.62% after 30 minutes of incubation, in skeletal muscle BAY-60-6583(100nM) by 47.51%, 59.06% and 66.22% after 10, 30 and 60 minutes of incubation and in adipose tissue BAY-60-6583 (100 nM) by 48.43% and 47.55%

after 30 and 60 minutes of incubation and with BAY-60-6583(1 μ M) 57.46% after 30 minutes of incubation.

In Hsu animals: CPA does not affect the NO production in all tissues tested (liver, skeletal muscle and adipose tissue). CGS-21680 30 and 100nM significantly increase NO production in liver by 55.13% and 41.06%, after 30 minutes of incubation; in skeletal muscle, CGS-21680 (100nM) significantly increase NO production by 77.91%, 119.53% and 77.28% after 10, 30 and 60 minutes of incubation without affect adipose tissue. BAY-60-6583 decreases NO production by 39.12% in liver after 30 minutes of incubation, and in adipose tissue by 38.94% and 43 25% after 10 and 30 minutes of incubation.

Regarding the iNOS, in this experiment it is not altered in Hsu diet model.

We conclude that in adenosine modulates NO production through A₁ and A_{2B} recetors in the liver and soleus muscle and through A_{2A} and A_{2B} recetors in the adipose tissue. In insulin resistant animals there is an increase in adenosine A_{2A} recetor-mediated NO production in the liver, and there is an increased NO production in soleus muscle which is inhibited by A₂ adenosine agonists.

Key words: Type 2 diabetes, adenosine, nitric oxide, iNOS (inducible nitric oxide synthase), insulin resistance.

Índice

Diabetes.....	1
Diabetes <i>metillus</i> tipo 2.....	1
Pré diabetes	3
Óxido nítrico	3
Adenosina.....	6
Recetores de Adenosina	7
Interações adenosina-óxido nítrico.....	9
Objetivo.....	11
Materiais e métodos.....	11
Animais	11
Estudo do efeito de adenosina na libertação de óxido nítrico	12
Análise por <i>Western blot</i> da expressão proteica da iNOS	13
Fármacos e químicos.....	14
Análise de dados.....	15
Resultados	15
Efeito da dieta rica em sacarose nos níveis de NO no fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo	15
Efeito do CPA, agonista dos recetores de adenosina do subtipo A ₁ , na produção de NO em animais controlo e submetidos a dieta HSu	16
Efeito do CGS26180, agonista dos recetores de adenosina do subtipo A _{2A} , na produção de NO em animais controlo e submetidos a dieta HSu.....	18
Efeito do BAY-60-6583, agonista dos recetores de adenosina do subtipo A _{2B} , na produção de NO em animais controlo e submetidos a dieta HSu.....	19
Estudo do efeito da dieta rica em sacarose na expressão da iNOS nos tecidos sensíveis à insulina, fígado, músculo soleus e tecido adiposo	21
Expressão da iNOS no fígado	21
Expressão da iNOS músculo-esquelético	21
Discussão.....	22
Conclusão	27
Trabalhos futuros.....	27
Bibliografia.....	29
Anexos.....	35

Lista de Figuras

Figura 1- Representação esquemática do início/ progressão da diabetes tipo 2	2
Figura 2 - Via metabólica (clássica) que conduz à formação de óxido nítrico.	5
Figura 3- Metabolismo de adenosina.)	7
Figura 4 - Funções dos diferentes recetores de adenosina no tecido adiposo, fígado e músculo-esquelético.	8
Figura 5- Esquema representativo das incubações realizadas.....	12
Figura 6 - Quantificação de NO, medido como nitritos e nitratos	16
Figura 7- Efeito do CPA, um agonista dos recetores de adenosina A ₁ , na produção de óxido nítrico (NO)	17
Figura 8 - Efeito do CGS-21680 um agonista dos recetores de adenosina A _{2A} , na produção de óxido nítrico (NO)	19
Figura 9- Efeito do BAY-60-6583 um agonista dos recetores de adenosina A _{2B} , na produção de óxido nítrico (NO)	20
Figura 10 - Expressão da iNOS e de β -actina no fígado	21
Figura 11- Expressão da iNOS e de β -actina no músculo-esquelético	22
Figura 12 - Expressão da iNOS e de β -actina no fígado. Imagem completa de um gel representativo dos Western blots realizados	35
Figura 13- Expressão da iNOS e de β -actina no músculo-esquelético. Imagem completa de um gel representativo dos Western blots realizados	35
Figura 14- Curva de calibração de NOA	36

Índice de tabelas

Tabela 1- Efeito da ativação dos diferentes recetores de adenosina na produção de óxido nítrico (NO).....9-10

Tabela 2- Efeito do agonismo dos recetores de adenosina na produção de óxido nítrico.....27

Lista de Abreviaturas e Siglas

AC – adenilato ciclase

ADA – adenosina deaminase

Ado – adenosina

ADP – adenosina 5'-difosfato

AK – adenosina cinase

AMP – adenosina 5'-monofosfato

AMPK – proteína cinase adenosina 5'-monofosfato activada

ANOVA – *analysis of variance*

ATP – adenosina 5'-trifosfato

BAY-60-6583 – 2-[[6-Amino-3,5-dicyano-4-[4-(cyclopropylmethoxy)phenyl]-2-pyridinyl]thio]-acetamide

BH4- tetrahidrobiopterina

cAMP- adenosina monofosfato cíclica

CGS-21680 – 2-[4-(2-*p*-carboxietil) fenilamino]-5'-*N*-etilcarboxamido adenosina

CNT - transportadores de nucleosídeos concentrativos

CPA – N⁶-ciclopentiladenosina

CTR – controlo

DMSO – dimetilsulfóxido

DPCPX – 8-*cycle*-1,3-dipropylxanthine

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

eNOS – sintetase do óxido nítrico endotelial

ENT - sistema de transporte de nucleosídeos equilibrativo

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FMN- flavina mononucleotídeo

GABA - Ácido gama-aminobutírico

Glut4 – transportadores de glucose do tipo 4

GPJ - síndrome metabólico

HEPES - 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

HSu – dieta rica em sacarose

I.p. - intraperitoneal

IL-6 – interleucina-6

iNOS – sintetase do óxido nítrico indutível

mRNA – RNA mensageiro

MRS1754 – 8-(4-{[(4-cyanophenyl)carbamoylmethyl]-oxy}phenyl)-1,3-di(n-propyl)xanthine

MS - síndrome metabólico

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida

nNOS - sintetase do óxido nítrico neural

NO - óxido nítrico

NO_x– metabolitos de óxido nítrico

NOS - sintetase de óxido nítrico

p/v –rácio peso volume

PDE – fosfodiesterase

PI3K – fosfaditilinositol 3-cinase

PKB – proteína cinase B

ROS - espécies reativas de oxigénio

SAH – S-adenosil-homocisteína

SAHase – S-adenosil homocisteína hidrolase

SCH58261 – 2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine

T2D – diabetes tipo 2

TBS – Tampão Tris salino

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

TTBS – Tampão Tris salino com Tween

A diabetes é uma das desordens metabólicas mais comuns no mundo. Trata-se de uma doença crónica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina ^[1] suficiente, comumente definida como diabetes tipo 1, ou quando o organismo não a consegue utilizar corretamente, resistindo à sua ação, definida como diabetes tipo 2 (T2D).^{1,2} Existem ainda outros tipos de diabetes, como o caso da diabetes *mellitus* gestacional (diabetes diagnosticada durante a gravidez), e tipos específicos de diabetes devidos a outros fatores, como o caso de defeitos genéticos na função das células- β ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, entre outras.²

Diabetes *metillus* tipo 2

A diabetes *metillus* tipo 2, também conhecida como não insulino dependente, abrange cerca de 90% dos casos de diabetes, para além disso o número de pessoas com T2D tem aumentado progressivamente em todo o mundo. Estima-se que cerca de 9% da população adulta mundial sofra de diabetes, prevendo-se que em 2035 afete mais de 552 milhões de pessoas mundialmente.^{1,3} Portugal não é exceção, em 2010 a prevalência total de diabetes (diagnosticada e não diagnosticada), em pessoas entre 20 e os 79 anos, foi estimada em 11,7%. O número crescente de indivíduos com T2D representa, assim, um problema alarmante de saúde pública, com repercussões socioeconómicas graves, desde os custos associados ao seu tratamento, às complicações que acarreta (maior incidência de determinadas doenças como o caso das doenças cardiovasculares e outras), o que tem vindo a preocupar cada vez mais a sociedade.⁴

A diabetes tipo 2 está relacionada com fatores genéticos e ambientais, traduzindo-se em múltiplos distúrbios na homeostasia da glucose, representados, normalmente, pela diminuição da secreção da insulina e/ou resistência à insulina (IR) nos seus tecidos alvo, como o caso do músculo, fígado e tecido adiposo. Por outro lado, caracteriza-se também pela

^[1] A **insulina** é uma das principais hormonas responsáveis pela manutenção dos níveis de glucose no sangue, principalmente após a ingestão de alimentos. Esta hormona apresenta funções anabólicas de extrema importância, aumenta o aporte de glucose no músculo e tecido adiposo e inibe a produção hepática de glucose, estimula ainda o crescimento e diferenciação celular, promove a síntese de glicogénio e síntese proteica, estimula a lipogénese e inibe a degradação de lípidos e proteínas.^{121,122}

disfunção das células β , que têm como função manter os níveis de glicose no sangue normais, através da secreção de insulina.^{5,6,7}

A diminuição da sensibilidade à insulina é, normalmente, a primeira anomalia detetável na T2D, sendo numa fase inicial contrabalançada por um aumento na secreção de insulina pelas células- β do pâncreas, o que leva a uma hiperinsulinemia (elevação da insulina na corrente sanguínea - plasma).^{5,6,8} No entanto, esta constante hipersecreção de insulina, a longo-termo (10-15 anos), leva a uma falência das células- β , que se traduz numa diminuição da secreção de insulina e num consequente aumento da glicose plasmática (ver figura 1).^{9,10} A IR é, em grande parte, o resultado de excesso de peso e inatividade física, e é vulgarmente associada à hiperglicemia, hiperlipemia e hipertensão.^{11,12,13,14,15} Esta combinação é reconhecida como "síndrome metabólica" (MS) e torna-se um fator de risco *multiplex* que surge quando a IR é acompanhada por anormal deposição e função do tecido adiposo, aumentando, assim, o risco de doenças coronárias, bem como de diabetes, esteatose hepática e vários tipos de cancro.^{1,8}

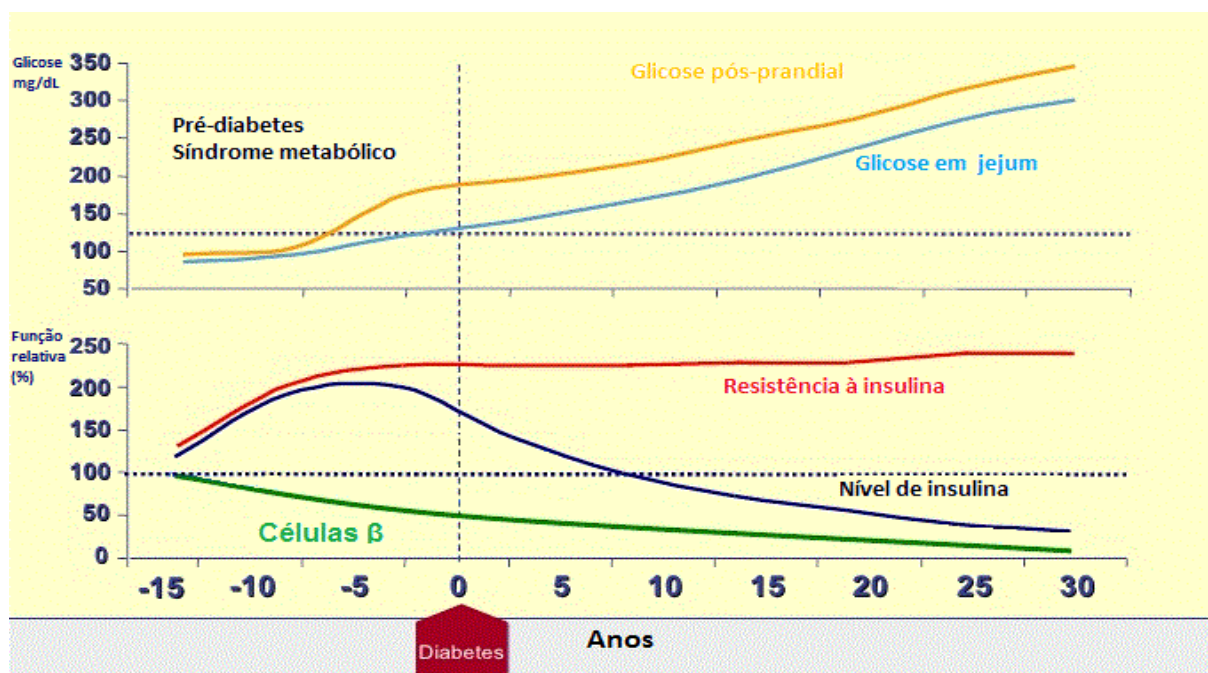


Figura 1- Representação esquemática do início/ progressão da diabetes tipo 2. Comparação entre a função relativa (%) dos níveis de insulina e resistência à insulina, e a concentração de glicose (mg/dL (adaptada de: <http://www.slideshare.net/drmxud/module-iii-complications-of-dm>, Agosto 2015).

Pré diabetes

A pré-diabetes é caracterizada por IR com níveis de glucose no sangue aumentados (glucose plasmática em jejum (GPJ) $> 100\text{mg/dL}$), mas inferiores aos considerados para a T2D (GPJ $\geq 126\text{mg/dL}$) (ver figura 1). É um estado eminente de risco do desenvolvimento de diabetes, pois o individuo apresenta resistência à insulina e disfunção das células β do pâncreas.¹⁶

Em suma, inerentes à diabetes, estão associados vários fatores de risco, alguns não passíveis de controlo, como o caso da predisposição genética, a idade (maior prevalência em pessoas com idade superior a 45 anos), o género (mulheres que desenvolveram diabetes gestacional têm maior risco de vir a desenvolver diabetes tipo 2) e a etnia (predominante em nativos americanos).^{17,18,19} Por outro lado, alguns são controláveis, como o caso do sedentarismo, a obesidade e a dieta adotada. A adoção de hábitos de vida saudáveis, como a prática regular de exercício físico e uma alimentação saudável diminuem o risco de desenvolver diabetes.^{15,20,21,22}

Atualmente, embora se utilizem antidiabéticos orais e insulina para o tratamento da diabetes, a maioria deles têm, geralmente, baixa eficácia e vários efeitos adversos e, portanto, têm sido propostas várias linhas de investigação para procurar novas estratégias terapêuticas para o tratamento desta doença. Em 1994, Steinberg e colaboradores demonstraram que a inibição da produção do óxido nítrico (NO) induzia IR e prejudicava a captação da glucose, uma vez que prevenia a vasodilatação no músculo-esquelético induzida pela insulina.²³ Desde então, têm surgido propostas de que a modulação dos níveis e/ou ação de NO poderá ser uma nova estratégia para manter a homeostasia da glucose em pacientes com T2D.²⁴

Óxido nítrico

O óxido nítrico tem vindo a ganhar notoriedade desde que, em 1992, foi distinguido como “molécula do ano” pela revista Science e, mais ainda, com a atribuição do Prémio Nobel em Fisiologia/Medicina, em 1998, a Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad pelas suas descobertas sobre “o óxido nítrico como uma molécula de sinalização no sistema cardiovascular”. Apesar da descoberta de NO remontar a 1772 (Joseph Priestley), o seu papel ainda é um pouco dúbio. São-lhe atribuídas diferentes ações, de acordo com o seu local de síntese, da quantidade produzida, do tipo de isoenzima envolvida na sua liberação e do

microambiente onde vai atuar. Em mamíferos é descrito como uma molécula de sinalização com uma ampla gama de efeitos, tendo sido implicado em diversos processos fisiológicos. Entre esses processos, encontram-se a manutenção da homeostasia vascular, pois sendo um vasodilatador endógeno mantém o tônus vasodilatador em toda a árvore arterial e limita qualquer aumento da pressão arterial sistêmica; a coagulação do sangue, devido ao seu papel de anti-agregante plaquetário endógeno; a sua potente atividade anti-inflamatória e anti-aterogénica; o seu auxílio na resposta imune, atuando como um mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas, sendo, então, capaz de destruir patógenos e células tumorais; o seu papel na sinalização neuronal, atuando como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais.^{25,26,27,28}

O NO é considerado uma molécula de sinalização autócrina e parácrina que se difunde rapidamente através da maioria dos tecidos, mas que tem um tempo de semivida muito pequeno (cerca de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos).^{29,30} Quando entra em circulação é rapidamente inativado por radicais livres de oxigénio (o superóxido nítrico assim formado é altamente tóxico) e pelo grupo heme da hemoglobina, sendo então convertido a nitrato/nitrito, o que lhe permite estabilizar-se no sangue e tecidos.^{25,31,26,32,27,33} Não obstante, o NO pode ligar-se às globinas da hemoglobina, originando nitrosaminas. Estas, por sua vez, constituem uma via de transporte de NO, permitindo-lhe atuar em locais a jusante. A hemoglobina apresenta, então, uma relação ambivalente com o NO - se por um lado o inativa pelo grupo heme, por outro, proporciona-lhe uma ação à distância ao combinar-se com as suas globinas. Assim, o NO é potencialmente tóxico e a sua toxicidade evidencia-se particularmente em situações de *stress* oxidativo em que há produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), sem o aumento equivalente da resposta antioxidante. Esta situação é frequente em indivíduos diabéticos e é induzida pela hiperglicemia, aumento de ácidos gordos livres e a inflamação, que provocam um desequilíbrio na resposta antioxidante da célula, levando, consequentemente, ao aumento do *stress* oxidativo.^{34,35,36,37,38} Este aumento faz com que ocorra ativação de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, que levam a alterações na fosforilação do substrato do recetor de insulina, alterando a cascata de sinalização da insulina e, consequentemente, o aporte de glucose.

Não sendo uma substância circulante por excelência, uma vez que é mais um mediador local, o NO precisa de ser continuamente secretado, dependendo de uma enzima específica – a sintetase de óxido nítrico (NOS).³⁹ Nitritos e nitratos, por outro lado, podem considerar-se como moléculas endócrinas que são transportadas no sangue, acumulam-se nos tecidos e têm potencial para serem reconvertidas a NO sob condições fisiológicas e patológicas.^{40,41}

Praticamente todas as células humanas estudadas até agora, têm a capacidade de produzir NO. Quando há níveis elevados de oxigénio no tecido, o NO produzido provém principalmente da transformação do aminoácido semi-essencial L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico, numa reação catalisada pela enzima NOS (figura 2).^{30,42,43,44}

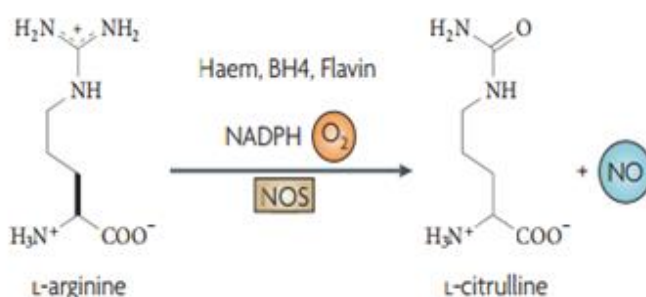


Figura 2 - Via metabólica (clássica) que conduz à formação de óxido nítrico. A oxidação do átomo de azoto terminal do amino ácido L-arginina, para formar L-citrulina e óxido nítrico (NO), dá-se na presença de oxigénio (O₂), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida (NADPH), e outros co-factores, tais como tetrahydrobiopterina (BH₄), (lavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo(FMN) e óxido nítrico (NOS)

No Homem e em outras espécies de mamíferos foram identificadas três isoformas distintas da NOS: o tipo I (nNOS), que se expressa constitutivamente no sistema nervoso; o tipo II (iNOS) que é uma isoforma indutível e, como tal, necessita de um estímulo para iniciar a sua produção/ativação, e o tipo III (eNOS) que é um enzima constitutivamente expressa nas células endoteliais. Estas três isoenzimas diferem não somente no local onde são expressas, mas também da sua dependência ao ião cálcio. Por um lado, a atividade dos tipos I e III depende do complexo Ca²⁺-Calmodulina, enquanto o tipo II é independente da presença de Ca²⁺ intracelular, sendo regulado a nível da sua expressão genética por ação de citocinas e outros mediadores inflamatórios.³¹

A enzima iNOS é regulada transcriptionalmente, sendo induzida em diferentes tipos de células, principalmente nos macrófagos e nas células musculares lisas após a estimulação de agentes pró-inflamatórios, como endotoxinas, a interleucina-1β, o Fator de Necrose Tumoral (TNF-α) e o interferão γ. Esta enzima tem como função principal produzir NO em grande quantidade, para garantir as atividades antimicrobiana, citostática e imunorregulatória.^{45,46}

Num estudo realizado por Higashino e colaboradores (2010) foi demonstrado que as concentrações plasmáticas de NO em indivíduos diabéticos eram superiores às dos voluntários saudáveis.⁴⁷ Contudo, o papel de NO tem sido controverso, uma vez que uma menor biodisponibilidade do eNOS, tem sido descrita como um maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas, em especial para disfunção vascular, doença

cardiovascular, doença renal crônica, distúrbios endócrinos, resistência à insulina, síndrome metabólica e diabetes tipo 2.^{48,22,49} De igual forma, os ácidos gordos livres, que estão elevados em estados de resistência à insulina, inibem a atividade da eNOS, diminuindo a produção de NO.⁵⁰ Por outro lado, outros estudos mostram que a inibição da NOS reduz a entrega de nutrientes e atenua a captação de glucose estimulada por insulina no músculo-esquelético.^{51,52}

Sabe-se, também, que a T2D prejudica as propriedades biológicas da vasculatura venosa e, em particular, reduz a liberação de NO derivado do endotélio⁵³, assim como a produção de NO que estimula o transporte de glucose no músculo-esquelético sendo esse efeito independente do fluxo sanguíneo em humanos.^{54,55}

Assim, o NO parece ter um papel fundamental na regulação não só da sensibilidade à insulina mas na prevenção de se uma série de problemas metabólicos graves.

Adenosina

A adenosina (Ado) é uma substância ubíqua que regula processos fisiológicos e fisiopatológicos no organismo, nomeadamente, as funções endócrina, cardiovascular, imune, renal e do sistema nervoso central, sendo que, na homeostasia da glucose, a adenosina parece ter um efeito insulino-sensibilizador.^{56,57,58,59} Este mediador é um produto do metabolismo do ATP e é formada pelo catabolismo dos 5'-adenosina- fosfatos (Ado 5'-trifosfato - ATP, Ado 5'-difosfato - ADP e AMP) pelas nucleotidases. No espaço intracelular, a Ado forma-se pela degradação do AMP pela 5'-nucleotidase ou pela hidrólise de S-adenosil-homocisteína (SAH).⁶⁰ No espaço extracelular, a Ado produz-se através do catabolismo do ATP por 5'-ectonucleotidases ou por degradação do cAMP. Este último é libertado para o espaço extracelular, onde é convertido em AMP e, por fim, em Ado por 5'-ectonucleotidases (figura 3).⁵⁷

As concentrações intra- e extracelulares de Ado são mantidas em equilíbrio por duas famílias de transportadores, os transportadores de nucleósidos concentrativos (CNT), sendo estes dependentes de sódio e permitindo o transporte da Ado para o espaço intracelular, e um sistema de transporte de nucleosídeos equilibrativo (ENT), independente de sódio e cujo transporte é bidirecional (figura 3).^{57,60,61,62} Existem duas enzimas que constituem a maior via para a degradação da Ado: a Ado cinase (AK) e a Ado deaminase (ADA). A Ado cinase é um enzima intracelular que converte a Ado em AMP, sendo ativada por concentrações fisiológicas de Ado.⁶⁰ A Ado deaminase, por sua vez, está maioritariamente presente no

quando as concentrações de Ado são elevadas.⁶³

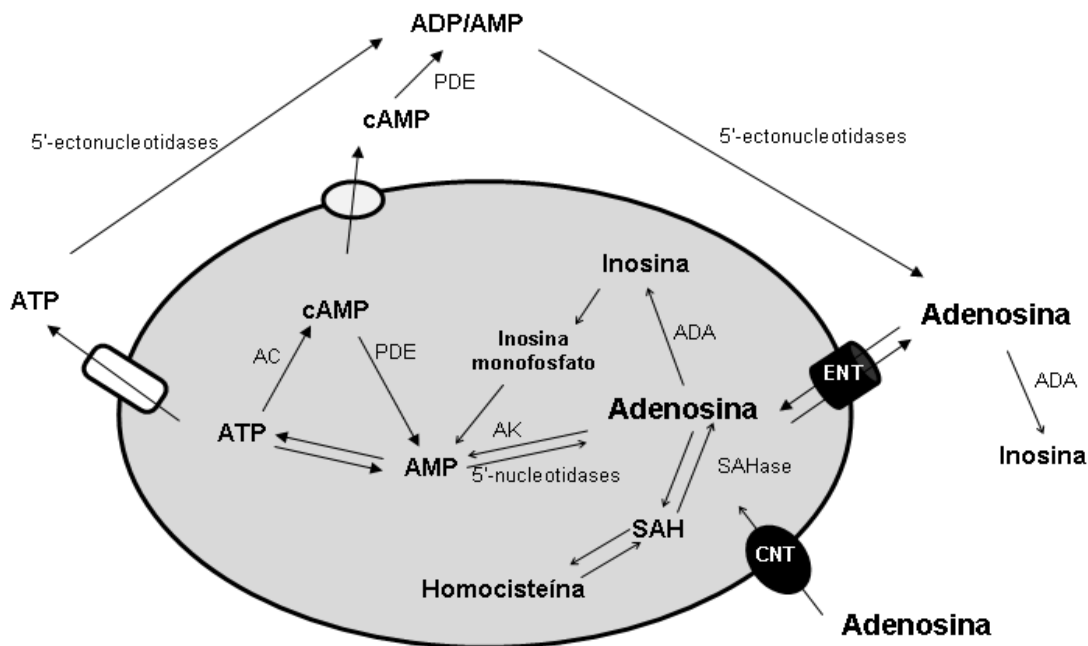


Figura 3- Metabolismo de adenosina. AC, adenilato ciclase; ADA, adenosina deaminase; AK, adenosina cinase; CNT, transportadores de nucleosídeos concentrativos; ENT, sistema de transporte de nucleosídeos equilibrativo; PDE, fosfodiesterase; SAH, S-adenosil-homocisteína hidrolase. (Adaptado de Latini e Pedata, 2001; Conde et al., 2009)

Recetores de Adenosina

A adenosina atua através de 4 diferente tipos de recetores associados a proteínas G. Os recetores A₁, os recetores A₂, que estão subdivididos em A_{2A} e A_{2B} e, por último, os recetores A₃. Os recetores A₁, para além de estarem acoplados a proteínas Gi_{1/2/3}, também podem estar acoplados a proteínas G₀. Já os recetores A_{2A} e A_{2B}, para além de estarem acoplados a proteínas G_s, podem também ativar G_{olf} e G_q, respetivamente. Relativamente aos recetores A₃, estes ativam maioritariamente proteínas Gi₀, mas também podem ativar G_q.^{56,64}

A ativação das proteínas G induz alterações na atividade de enzimas, como a adenilato ciclase, e a abertura ou fecho de canais iônicos, como os canais de K^+ . Os recetores de adenosina do subtipo A_1 (K_i $1,30 \times 10^{-9}M$) atuam através da inibição da adenilato ciclase, da ativação de diversos tipos de canais de K^+ e da inibição de canais Ca^{2+} do tipo N, O e Q, e ativam a fosfolipase C, entre outros.^{56,60,62,65,66} O papel destes recetores na secreção de insulina não é consensual, uma vez que há autores que defendem que estes recetores podem aumentar a produção de insulina,^{67,68,69,70} e outros que afirmam que também a pode

diminuir.⁷¹ Assim, os resultados contraditórios que se têm obtido relativamente ao papel de adenosina na secreção da insulina, demonstram, acima de tudo, que as consequências farmacológicas da manipulação dos seus recetores dependem muito das propriedades farmacocinéticas do fármaco utilizado, mas também do tecido alvo e das dosagens testadas. Assim, não se pode esperar que efeitos verificados num organismo, ou num tecido em particular, sejam semelhantes, e vice-versa.

A adenosina inibe a lipólise e estimula a lipogénese, principalmente via estimulação do recetor adenosina A₁, diminuindo os níveis plasmáticos de ácidos gordos livres e dos níveis de triglicerídeos. Os recetores A₁ são também capazes de baixar a produção de glucose, estimular a produção de glucagon e aumentar a glicogenólise hepática.⁷² Os recetores A_{2A} (K_i 1,99 x 10⁻⁷ - 7,94x 10⁻⁹M) e A_{2B} (K_i 1,00 x 10⁻⁸ – 3,00x 10⁻⁹M), para além de ativarem a adenilato ciclase, estimulam a formação de cAMP e também medeiam a mobilização de cálcio intracelular.^{73,74,75} Foi descoberto recentemente, que os recetores de adenosina A_{2A} desempenham também um papel fisiológico na ativação do sistema simpático, que promove a ativação do tecido adiposo castanho, protegendo da obesidade ratinhos submetidos a dietas hipercalóricas.⁷⁶ Por sua vez, os recetores A₃ aparentam mediar os mesmos efeitos que os recetores A₁.^{65,56,77,78}

A ativação dos diferentes recetores de adenosina culmina, então, em diferentes ações, consoante os tecidos alvo. Estas vêm sumarizadas na figura 4, onde é possível observar as diferentes ações da ativação dos diversos recetores de adenosina, nos principais tecidos alvo da insulina.^{79,80}

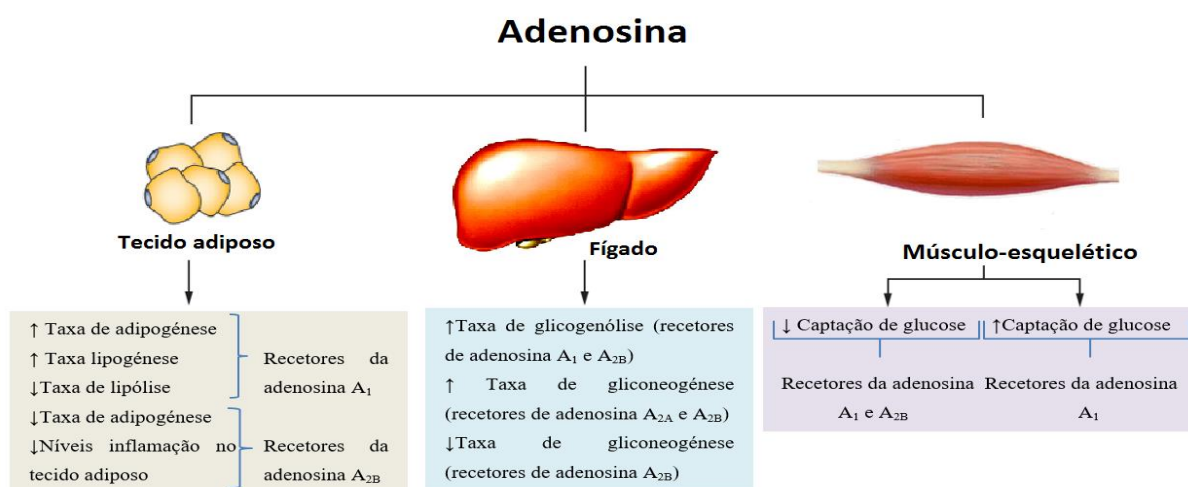


Figura 4 - Funções dos diferentes recetores de adenosina no tecido adiposo, fígado e músculo-esquelético. No tecido adiposo os recetores de adenosina A₁ aumentam a adipogénese e a lipogénese, e diminuem a lipólise, já os recetores de adenosina A_{2B} diminuem a adipogénese e a inflamação. No fígado, os recetores de adenosina A₁ e A_{2B} promovem a

glicogenólise e estimulam a gliconeogênese, por outro lado os recetores de adenosina A_{2B} podem também diminuir a gliconeogênese dependendo do modelo experimental utilizado. No músculo-esquelético, os recetores de adenosina A₁ tanto podem aumentar a captação de glucose como diminuí-la e, dependendo da experiência, enquanto os recetores de adenosina A_{2B} apenas diminuem a absorção de glucose. (Adaptado: Antonioli L, et al. Adenosine signalling in diabetes mellitus—pathophysiology and therapeutic considerations. Nat Rev Endocrino 2015;1-14. l)

Interações adenosina-óxido nítrico

Ao longo das últimas duas décadas, têm sido efetuados diversos estudos que relacionam a produção de óxido nítrico com a ativação dos recetores de adenosina. Skinner e Marshall (1996) mostraram, pela primeira vez, que a vasodilatação do músculo, induzida pela adenosina durante a hipoxia sistémica, estava dependente da síntese de NO, teoria mais tarde adotada por outros autores também.^{81,82} Posteriormente, Marshall e colaboradores (2002) demonstraram também que, durante a hipoxia sistémica, a adenosina atuava via recetores A₁ de forma a aumentar a síntese de prostaglandinas, talvez através da produção de cAMP, o que aumentava a síntese e libertação de NO, causando a vasodilatação do músculo.⁸³ Assim, ao longo destes últimos anos, vários têm sido os autores a relacionar alterações na produção de NO com a expressão de alguns dos recetores de adenosina (tabela 1).

Tabela 3- Efeito da ativação dos diferentes recetores de adenosina na produção de óxido nítrico (NO)

Recetor de adenosina	Efeito	Referência
A ₁	No músculo-esquelético: ↑síntese de prostaglandinas, talvez através da produção de cAMP; ↑síntese e libertação de NO,	Marshall, J. (1996) ^{82,83, 84}
A ₁ A ₂ e A ₃	No rim: ↓produção de NO; ↑produção de NO;	Franco, M. (2002) ⁸⁵
A ₁ A ₂	Vasculatura: Induz vasoconstrição ↓ atividade da adenilato ciclase e a secreção de renina;	Osswald, H. (1998) ⁸⁶

	Induz vasodilatação ↑ atividade da adenilato ciclase e a secreção de renina;	
A _{2A} A ₁	Células endoteliais de artérias humanas e de porcos: ↑ produção de NO; ↓ produção de NO;	Li, J. (1999) ⁸⁷
A ₁ e A ₂	Aorta: ↑ liberação de NO de forma dependente dum aumento do cAMP	Ray, C. (1983) 83,88
A _{2A}	Induzem a dilatação arteriolar da retina, ↑ produção de NO e abertura dos canais K _{ATP} .	Hein, T. (1998) 89
A ₂	↑ produção de NO, protegendo contra a lesão hepática associada à isquemia-reperusão	Peralta, C. (2005) ⁹⁰
A ₂	Células musculares lisas vasculares: ↑ produção de NO	Ikeda, U. (1997) 91
A _{2B}	Cultura de células endoteliais da artéria coronária de porco ↑ NO produção	Olanrewaju, H. (2000) ⁹²
Infusão de adenosina	Músculo-esquelético ↑ NO	Nyberg, M. (2010) ⁹³

Mais recentemente, num estudo realizado por Sacramento e colaboradores (2015), foram administrados, de forma aguda, antagonistas dos recetores de adenosina, nomeadamente a cafeína, um antagonista não seletivo, e antagonistas seletivos dos diferentes recetores de adenosina A₁, A_{2A} e A_{2B}, respetivamente, DPCPX, SCH58261 e MRS1754. Observou-se que a cafeína diminuía a sensibilidade à insulina, sendo este efeito mimetizado por antagonistas dos recetores A₁ e A_{2B}. Os mesmos autores demonstraram também que a administração de um dador de NO revertia a IR induzida pelo antagonismo dos recetores A₁ e A_{2B}, o que significava que o NO seria um elemento fundamental na sensibilidade à insulina mediada pela adenosina.⁵⁹ Estes resultados sugerem que na presença de um antagonista não seletivo de adenosina, como a cafeína, ou dos antagonistas seletivos dos recetores A₁ e A_{2B}, haveria uma diminuição das concentrações de adenosina que se traduziria numa diminuição nas concentrações de NO, o que levaria a um aumento da resistência à insulina. Assim, ficava

por esclarecer como a interação entre a adenosina e o NO poderia estar associada a alterações na sensibilidade à insulina.

Objetivo

Sabendo que a adenosina pode modular a libertação de NO em diferentes tecidos, e conhecendo-se também o papel chave que a adenosina e o óxido nítrico detêm na sensibilidade à insulina, este trabalho teve como objetivo geral investigar se uma interação entre a adenosina e o NO poderia estar associada a alterações na sensibilidade à insulina.

Os objetivos específicos foram:

- Investigar se a produção de NO estava aumentada nos tecidos sensíveis à insulina, fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo, num modelo animal de insulinoresistência, o rato HSu;
- Investigar se a alteração na produção de NO em animais insulinoresistentes se deve a uma alteração da expressão e ativação da iNOS nos tecidos sensíveis à insulina, músculo-esquelético e fígado;
- Investigar as interações entre o NO e a adenosina responsáveis pela produção de NO em animais controlo e a sua possível desregulação em animais insulinoresistentes;

Materiais e métodos

Animais

As experiências foram realizadas em ratos jovens *Wistar* de ambos os sexos (152-498g), adquiridos no Biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (FCM-UNL). Os animais foram mantidos com controlo de temperatura e humidade ($21 \pm 1^\circ\text{C}$; $55 \pm 10\%$ humidade), com ciclos de 12h luz – 12h escuridão. Na véspera do protocolo experimental, os animais foram submetidos a um jejum noturno (> 8 horas), com livre acesso à água. Na manhã seguinte os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 60 mg/kg e foi realizado o protocolo experimental. Todos os procedimentos foram executados de acordo com a diretiva da União Europeia, “European Union Directive for Protection of Vertebrates Used for Experimental and Other Scientific Ends” (2010/63/EU) e foram previamente aprovados pelo Comité de Ética da FCM-UNL.

Estudo do efeito de adenosina na libertação de óxido nítrico

De modo a avaliar os efeitos de adenosina na libertação de óxido nítrico na insulinoresistência, os ratos foram divididos em 2 grupos: (1) grupo controlo e (2) grupo com uma dieta rica em sacarose (HSu), um modelo magro que combina resistência à insulina e hipertensão. O grupo controlo tinha livre acesso à água e a uma dieta *standard* com 7,5% gordura + 75% carboidratos (4% açúcar) + 17% proteína (SDS *diets* RM1, probiotica, Portugal). Por sua vez, no grupo HSu, a os animais foram submetidos uma dieta sólida *standard* durante 28 dias, mas adicionou-se 35% de sacarose na água (p/v). Para estudar qual(ais) o(s) subtipo(s) de recetores de adenosina que poderiam estar envolvidos em alterações na libertação de óxido nítrico, os ratos, após anestesia, foram sacrificados e os tecidos, fígado, tecido adiposo visceral e o músculo-esquelético *soleus* foram extraídos e incubados *in vitro* durante 3 tempos distintos, 10, 30 e 60 minutos, numa solução de *tyrode* bicarbonato a pH 7,4, composta por: NaCl 116mM; KCl 5mM; CaCl₂ 2mM; MgCl₂ 1,1mM; HEPES 10mM; Glucose 5,5mM; NaHCO₃ 24mM (gaseada em condições de normóxia com 20% de O₂, 5% de CO₂ e 75% de N₂). Os tecidos foram incubados na presença ou na ausência dos seguintes agonistas dos recetores de adenosina: CPA: agonista dos recetores de adenosina A₁, com as concentrações de 3 e 30nM; CGS-21680, agonista dos recetores de adenosina A_{2A}, com as concentrações de 30 e 100nM; BAY-60-6583 e agonista dos recetores A_{2B}, com as concentrações de 100nM e 1μM. (figura 5):

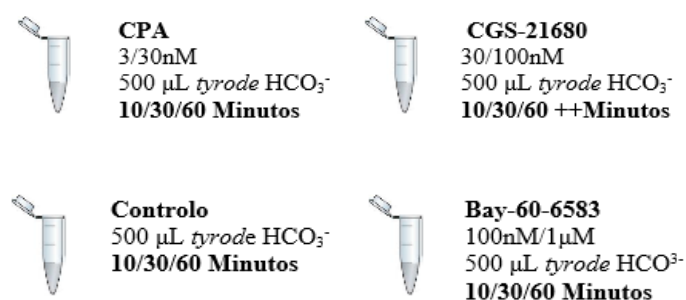


Figura 5- Esquema representativo das incubações realizadas, na presença ou na ausência de diferentes concentrações dos agonistas dos recetores de adenosina, BAY-60-6583 (agonista dos recetores de adenosina A_{2B}), CPA (agonista dos recetores de adenosina A₁) e CGS-21680 (agonista dos recetores de adenosina A_{2A}).

Para proceder à quantificação de NO nas amostras, estas foram pesadas (Mettler Toledo, Portugal) e homogeneizadas num homogeneizador automático (Heidolph, Alemanha) em tampão Tris-HCl pH 7.4 com 10 mM EDTA e 10 mM EGTA.

Depois de homogeneizadas, os fígados e músculo-esqueléticos foram centrifugados (Eppendorf, Espanha) a 13,000g, durante 20 minutos, a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e procedeu-se à desproteinização das amostras. No caso do tecido adiposo, antes da desproteinização, procedeu-se à recolha do sobrenadante e a uma nova centrifugação deste de 13,000g, durante 10 minutos, a 4°C. Para a desproteinização diluiu-se o sobrenadante com etanol absoluto (3x volume a 4°C). Agitou-se no vórtex e colocou-se em gelo durante 30 minutos. Após este período, centrifugou-se a amostra a 13,000g, durante 15 minutos, e recolheu-se o sobrenadante.

O NO contido então nos homogeneizados, foi determinado por quimioluminescência, utilizando um analisador de NO (*Sievers 280™ NO analyser*, Sievers Instruments, EUA), no qual os nitritos e nitratos são reduzidos a NO quando em contacto com o cloreto de vanádio III (VCl₃) a 90°C. O NO, formado em reação com o ozono, emite um fotão que é detetado num fotomultiplicador que, por sua vez, emite um sinal elétrico que é quantificado. Os resultados são apresentados em µM/grama de tecido (para mais pormenores sobre os métodos ver anexo IV).

Análise por *Western blot* da expressão proteica da iNOS

Os tecidos, fígado e o músculo *soleus*, foram homogeneizados num homogeneizador automático (Heidolph, Alemanha), sendo que as amostras referentes a músculo-esquelético *soleus* (50mg) foram homogeneizadas em meio Zurich (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; NaCl 150mM; Triton X-100 1%; Colato de sódio 1%; SDS 1%), ao qual foi adicionado um cocktail de inibidores de proteases (tripsina, pepstatina, leupeptina, aprotinina ortovanadato de sódio, PMSF). As amostras de fígado (0,1g), por sua vez, foram homogeneizadas num tampão com Tris-HCl 100mM; EGTA 0.2 M; EDTA 0.2 M; Triton-x 100; Sucrosa 0.27 M; suplementado com o mesmo cocktail de inibidores de proteases.

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugados (Eppendorf, Madrid, Espanha) a 13000g, durante 20 minutos. Procedeu-se, de seguida, à recolha do sobrenadante, que foi congelado a -80°C até posterior utilização.

A concentração de proteína dos homogeneizados foi determinada através de um método colorimétrico Micro-BCA (Pierce, Madrid, Espanha).

As amostras dos homogeneizados (50µg) e de marcadores de peso molecular conhecido (Precision, Biorad, Madrid, Espanha) foram separadas por SDS-PAGE (10%) em condições redutoras.

Após a separação das amostras por SDS-PAGE, estas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (0,2 μ M, BioRad, Espanha). De seguida, as membranas foram incubadas durante 5 minutos numa solução de vermelho de Ponceau (0,1%) em ácido acético e lavadas com água Mili-Q. Posteriormente, foram guardadas a 4°C durante a noite. Após o bloqueio da ligação não específica feito durante uma hora, à temperatura ambiente, com uma solução de I-Block 0,5% (Applied Biosystems, EUA) em TTBS (0,02%), as membranas foram incubadas, durante duas horas, com o anticorpo primário monoclonal rato anti-NOS2 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Europe). Seguidamente, procedeu-se a 4 lavagens de 15 minutos com TTBS (0,02%). As membranas foram incubadas durante 90 minutos com o anticorpo secundário conjugado com biotina anti-rato (1:10000) (Millipore, Espanha). Após a lavagem do anticorpo secundário, as membranas foram incubadas durante 30 minutos com o anticorpo terciário conjugado com streptavidina (1:10000) (Pierce, EUA). De seguida, procedeu-se à lavagem das membranas com TTBS. Após a lavagem do anticorpo terciário, as membranas foram incubadas com reagente de quimioluminescência (Immobilon western, Millipore, Espanha) para a deteção da proteína de interesse. A intensidade do sinal foi detetada no Chemidoc Molecular Imager (Chemidoc BioRad, Espanha). Por último, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal rato anti- β -actina (1:1000) (Sigma-Aldrich, EUA), para posterior normalização. Depois de 4 lavagens de 15 minutos com TTBS (0,02%), as membranas foram incubadas durante 90 minutos com o anticorpo secundário conjugado à biotina anti-rato (1:10000) (Millipore, Espanha). Após a lavagem do anticorpo secundário, as membranas foram incubadas com o anticorpo terciário conjugado com streptavidina (1:10000) (Pierce, EUA), como descrito previamente. Esta incubação para a β -actina permitiu comparar e normalizar a expressão das proteínas em relação à proteína de referência, a β -actina. A intensidade média das amostras controlo em cada membrana foi utilizada como referência para controlar as variações inter gel.

Fármacos e químicos

A aprotinina, colato de sódio, EDTA, leupeptina, NaCl, ortovanadato de sódio, pepstatina, PMSF, Ponceau S, tripsina, Tris, Triton X-100, cloreto de vanádio III, nitrato de sódio foram obtidas na Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha). A sacarose foi obtida da Panreac (Madrid, Espanha).

Os dados foram analisados utilizando o *Graph Pad Prism Software*, versão 5 (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA*) e apresentados com média \pm SEM. A significância das diferenças entre as médias foi calculada através do *One e Two-Way Analysis of Variance* (ANOVA) com os testes de comparação múltipla *Bonferroni* e *Dunnett* e, *Bonferroni*, respetivamente. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Resultados

O NO possui um papel chave na regulação de diversas funções e os seus efeitos metabólicos, vasculares e celulares permitem-lhe ser considerado uma molécula chave na regulação do nosso organismo. Enquanto que níveis baixos de NO parecem ser benéficos para diversas funções celulares e fisiológicas, níveis muito elevados de NO são associados ao detrimento dessas mesmas funções. Na T2D, tal como anteriormente descrito, há alteração dos níveis de NO no soro. Contudo, os resultados descritos na literatura são bastante controversos.

Neste trabalho pretendeu-se quantificar os níveis de NO nos tecidos sensíveis à insulina (fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo), em ratos *Wistar* controlo e insulinoresistentes.

Efeito da dieta rica em sacarose nos níveis de NO no fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo

Os valores de NO presentes no tecido adiposo, fígado e músculo-esquelético (*soleus*) de animais controlo são $15,35 \pm 2,51$, $26,04 \pm 4,32$ e $54,63 \pm 5,28$ nmol/grama de tecido, respetivamente (figura 6). Observou-se que a concentração de NO no músculo-esquelético é significativamente maior do que a do fígado, 109,78%, e que a do tecido adiposo, 255,79%.

A dieta HSu não alterou significativamente a produção de NO no tecido adiposo ($19,23 \pm 1,22$). Porém, esta encontra-se significativamente diminuída - em 40,52% no fígado ($NO_{Hsu} = 15,49 \pm 1,20$ nmol/grama de tecido) e em 41,00% no músculo-esquelético (*soleus*) ($NO_{Hsu} = 31,41 \pm 2,51$ nmol/grama de tecido).

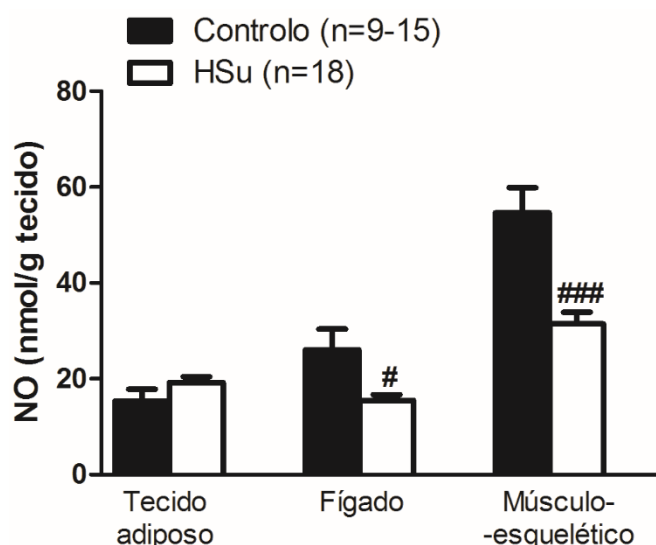


Figura 6 - Quantificação de NO, medido como nitratos e nitritos, presente no tecido adiposo, fígado e músculo-esquelético em animais controlo e animais sujeitos a uma dieta rica em sacarose (HSu). As barras representam valores médios \pm S.E.M. # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ Test t-student

Efeito do CPA, agonista dos recetores de adenosina do subtipo A₁, na produção de NO em animais controlo e submetidos a dieta HSu

Os valores de NO presentes no fígado aos 10, 30 e 60 minutos de incubação em animais controlo (Sem adição de fármacos) foram $25,51 \pm 3,75$, $18,48 \pm 2,56$ e $12,30 \pm 1,98$ nmol/grama de tecido, respetivamente. No músculo-esquelético, as concentrações de NO obtidas para 10, 30 e 60 minutos de incubação foram $22,86 \pm 2,54$, $22,92 \pm 3,27$ e $25,79 \pm 4,41$ nmol/grama de tecido, respetivamente. No tecido adiposo, as concentrações de NO depois de 10, 30 e 60 minutos de incubação foram $11,51 \pm 2,089$, $18,73 \pm 5,475$ e $16,38 \pm 2,645$ nmol/grama de tecido, respetivamente. A dieta HSu aumentou de forma significativa a produção de NO no fígado e no músculo-esquelético (105,60%, 172,5% e 275,93% aos 10, 30 e 60 minutos de incubação para o fígado e 131,45%, 142,54% e 108,34% aos 10, 30 e 60 minutos de incubação para o músculo-esquelético), não acontecendo o mesmo no caso do tecido adiposo ($16,09 \pm 2,21$, $14,81 \pm 1,36$ e $19,52 \pm 3,24$ aos 10, 30 e 60 minutos de incubação respetivamente). Como se pode observar na figura 7.A, a concentração de 3nM promoveu um aumento de 64,56% e 115,20% na produção de NO em animais controlo, quando os tecidos foram incubados durante 30 e 60 minutos, respetivamente. Quando o fígado foi incubado com uma concentração de 30nM, pôde observar-se que esta concentração não alterou a produção

de NO nem em animais controle, nem HSu. A mesma situação ocorreu no caso do músculo-esquelético (Figura 7.B), em que, com a concentração de 3nM, se observou o aumento significativo de 79,45% da produção de NO aos 60 minutos e, no caso da concentração de 30nM, não se verificou alteração da produção de NO, nem em animais controle, nem HSu. Por outro lado, as duas concentrações de CPA testadas no tecido adiposo (Figura 7.C) não parecem alterar a produção de NO, nem em animais controle, nem HSu.

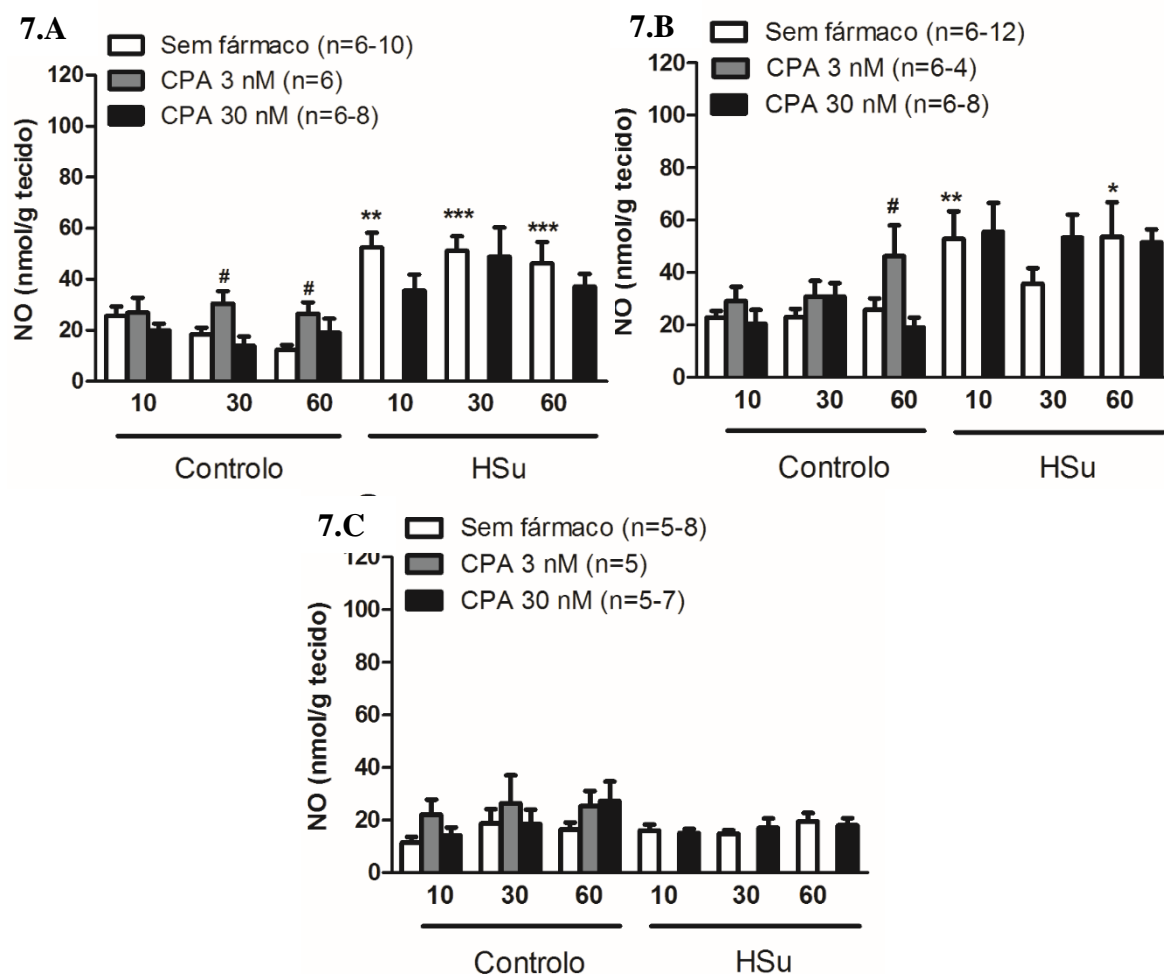
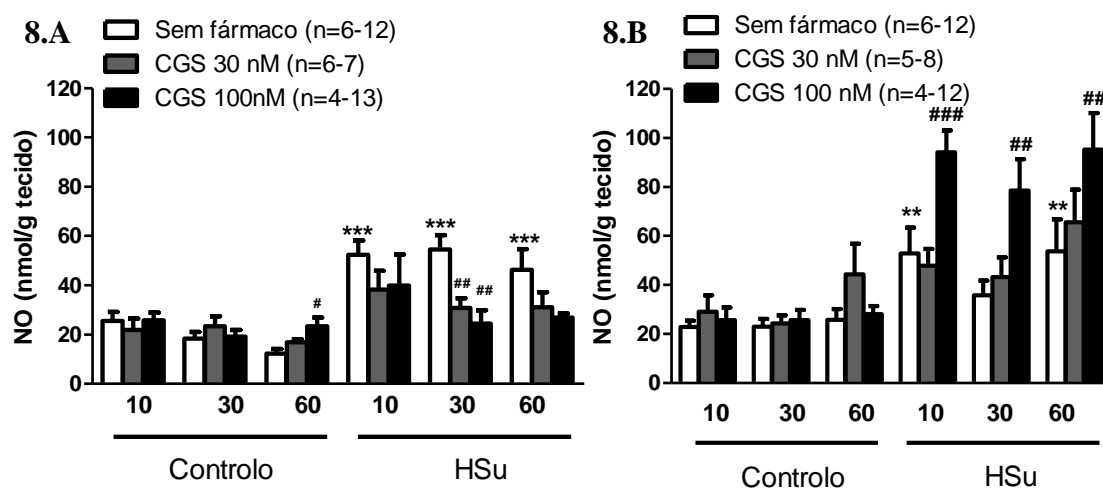


Figura 7- Efeito do CPA, um agonista dos receptores de adenosina A_1 , na produção de óxido nítrico (NO) no (A) fígado; (B) músculo-esquelético e (C) tecido adiposo em animais controle (com a dieta standard) e animais com a dieta rica em sacarose (HSu) na ausência e na presença de 3 e 30nM de CPA. As barras representam a média \pm SEM. A significância das diferenças entre as médias foi calculada através do One e Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) com os testes de comparação múltipla Bonferroni e Dunnett e, Bonferroni, respectivamente. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparando valores de animais controle e HSu com a adição das diferentes concentrações do CPA e ; $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, comparando animais controle e animais HSu sem a adição de fármacos.**

Efeito do CGS26180, agonista dos recetores de adenosina do subtipo A_{2A}, na produção de NO em animais controlo e submetidos a dieta HSu

Os valores de NO controlo nos diferentes tecidos (incubados durante 10, 30 e 60 minutos) utilizados para comparar com o efeito do CGS-216980, são os mesmos que os descritos na secção anterior para comparação com o CPA. Como se pode observar na figura 8.A, a concentração de 30nM de CGS-21680 não alterou significativamente a produção de NO no fígado. Por outro lado, o CGS-21680 numa concentração de 100nM, aumentou em 120,48% a produção de NO em animais controlo quando incubados durante 60 minutos e, quando testado em ambas as concentrações, estas diminuíram em 55,13% e 41,06%, respetivamente, a produção de NO aos 30 minutos, em animais HSu. No caso do músculo-esquelético (Figura 8.B), se por um lado as duas concentrações de CGS-21680 testadas parecem não alterar a produção de NO nos animais controlo, quando a concentração de 100nM é testada no modelo HSu há um aumento significativo da produção de NO de 77,91%, 119,53% e 77,28% para os 10, 30 e 60 minutos de incubação. O mesmo já não acontece com a concentração menor (30nM). Relativamente ao tecido adiposo (Figura 8.C), o CGS-21680 quando testado numa concentração de 30nM induziu a produção de NO aos 10 minutos em 106,52% em animais controlo, mas este efeito é perdido após tempos maiores de incubação. No caso do modelo Hsu no tecido adiposo, a incubação com CGS-21680 para as concentrações testadas não alterou a produção de NO (Figura 8.C).



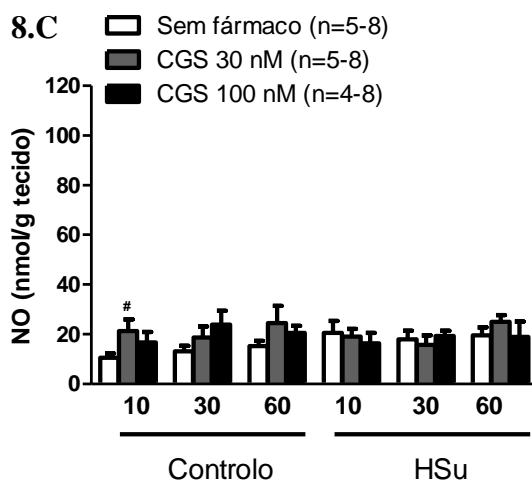
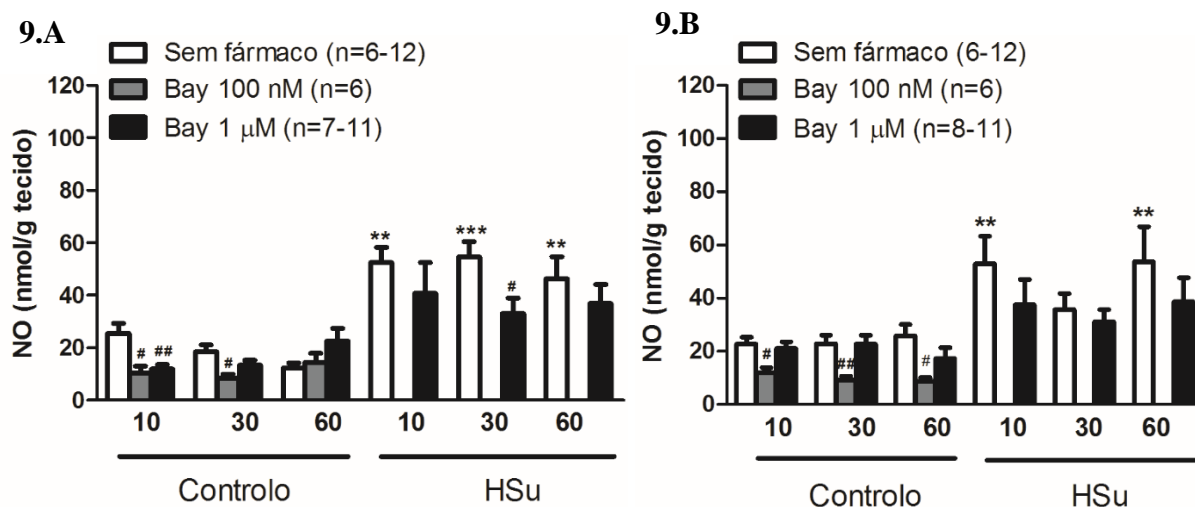


Figura 8 - Efeito do CGS-21680 um agonista dos recetores de adenosina A_{2A} , na produção de óxido nítrico (NO) no (A) fígado; (B) músculo-esquelético e (C) tecido adiposo em animais controlo (com a dieta standard) e animais com a dieta rica em sacarose (HSu) na ausência e na presença de 30 e 100nM de CGS-21680 As barras representam a média \pm S.E.M. A significância das diferenças entre as médias foi calculada através do One e Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) com os testes de comparação múltipla Bonferroni e Dunnett e, Bonferroni, respectivamente. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$; $\#p < 0,05$, $\##p < 0,01$, $\###p < 0,001$ comparando valores de animais controlo e HSu com a adição das diferentes concentrações do CPA e ; $p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, comparando animais controlo e animais HSu sem a adição de fármacos.

Efeito do BAY-60-6583, agonista dos recetores de adenosina do subtipo A_{2B} , na produção de NO em animais controlo e submetidos a dieta HSu

Os valores de NO controlo nos diferentes tecidos (incubados durante 10, 30 e 60 minutos) utilizados para comparar com o efeito do BAY-60-6583, são os mesmos que os descritos nas secções anteriores para comparação com o CPA e o CGS-21680.



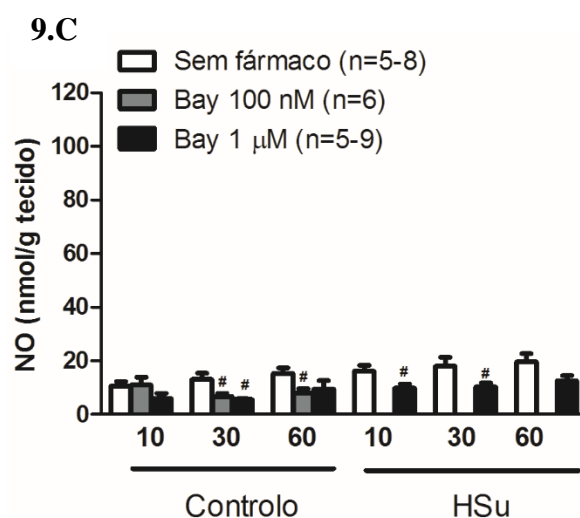


Figura 9- Efeito do BAY-60-6583 um agonista dos recetores de adenosina A_{2B} , na produção de óxido nítrico (NO) no (A) fígado; (B) músculo-esquelético e (C) tecido adiposo em animais controlo (com a dieta standard) e animais com a dieta rica em sacarose (HSu) na ausência e na presença de 100nM e 1µM de CGS-21680 As barras representam a média \pm SEM. A significância das diferenças entre as médias foi calculada através do One e Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) com os testes de comparação múltipla Bonferroni e Dunnett e, Bonferroni, respectivamente. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$; $\#p < 0,05$, $\# \# p < 0,01$, $\# \# \# p < 0,001$ comparando valores de animais controlo e HSu com a adição das diferentes concentrações do CPA e ; $p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, comparando animais controlo e animais HSu Sem adição de fármacos.

Tal como se pode observar na figura 9.A, o BAY-60-6583, quando testado numa concentração de 100nM, diminui a produção de NO aos 10 e 30 minutos, em animais controlo, em 59,19% e 53,16%, respetivamente e esse efeito é perdido aos 60 minutos. Observou-se também que 100nM de BAY-60-6583 diminuem a produção de NO em 54,62% após 30 minutos de incubação, relativamente aos animais com a dieta HSu; 100nM de BAY-60-6583 diminuem em 54,62% a produção de NO no fígado, relativamente aos animais HSu sem fármaco; e 1 µM não altera a produção de NO no fígado destes animais. Relativamente ao músculo-esquelético, o BAY-60-6583, quando aplicado em 100nM, diminui em 39,12% a produção de NO em animais controlo aos 30 minutos de incubação e, no modelo HSu, diminui aos 10, 30 e 60 minutos em 47,51%, 59,06% e 66,22%, respetivamente (Figura 9.B). O BAY-60-6583, quando aplicado numa concentração de 1µM, não alterou a produção de NO nem em animais controlo nem em animais HSu (Figura 9.B). No caso do tecido adiposo, o BAY-60-6583, quando aplicado numa concentração de 100nM, induziu a diminuição da produção de NO aos 30 e 60 minutos em 48,43% e 47,55%, nos animais controlo. Quanto ao BAY-60-6583, quando aplicado numa concentração de 1µM, diminui também a produção de NO em 57,46% aos 30 minutos, em animais controlo. Esse efeito manteve-se quando se testou a mesma concentração em animais HSu, sendo este efeito significativo aos 10 e 30 minutos de incubação, respetivamente, com uma taxa de decréscimo de 38,94% e 43,25%.

Estudo do efeito da dieta rica em sacarose na expressão da iNOS nos tecidos sensíveis à insulina, fígado, músculo soleus e tecido adiposo

Expressão da iNOS no fígado

Na figura 10 estão representados os *Western blots* que comparam a expressão de iNOS (NOS2) e β -actina no fígado, correspondentes às bandas 130kDa e 42kDa, respetivamente, para animais controlo e animais HSu.

Como se observa na figura 10 (para mais detalhe, ver anexo 1), a dieta HSu não modificou de forma significativa a expressão da iNOS no fígado.

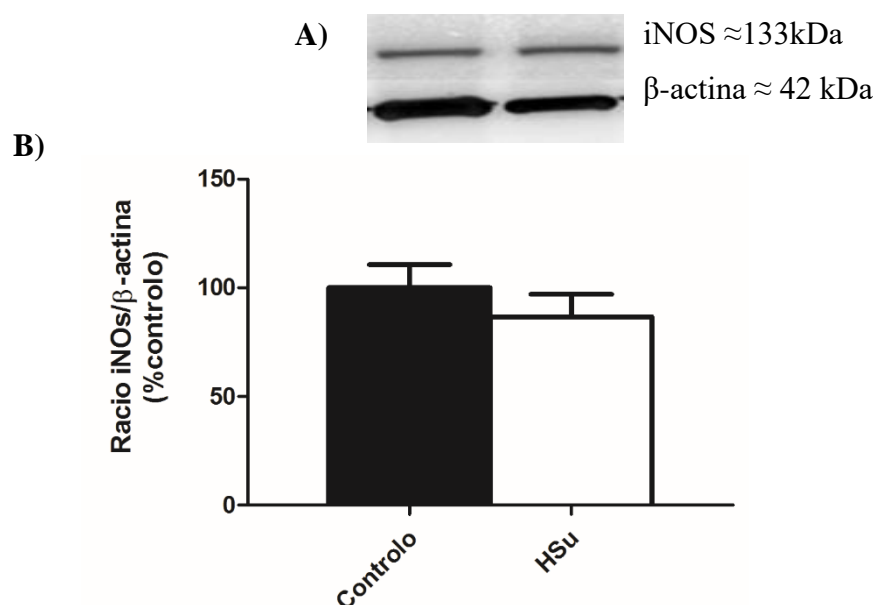


Figura 20 - Expressão da iNOS e de β -actina no fígado. A) Imagem representativa de *Western blots* que comparam a expressão da iNOS (133kDa) e β -actina (42kDa) no fígado de animais controlo e sujeitos a uma dieta com 35% de sacarose na água (HSu). B) Mostra, respetivamente, valores médios da expressão de iNOS ($n=11-12$) em relação à expressão de β -actina ($n=11-12$). As barras verticais representam a média \pm SEM.

Expressão da iNOS músculo-esquelético

Na figura 11 estão representados os *Western blots* que comparam a expressão de iNOS (NOS2) e β -actina no músculo-esquelético, o que corresponde às bandas 130kDa e 42kDa, respetivamente, para animais controlo e animais HSu (ver anexo II).

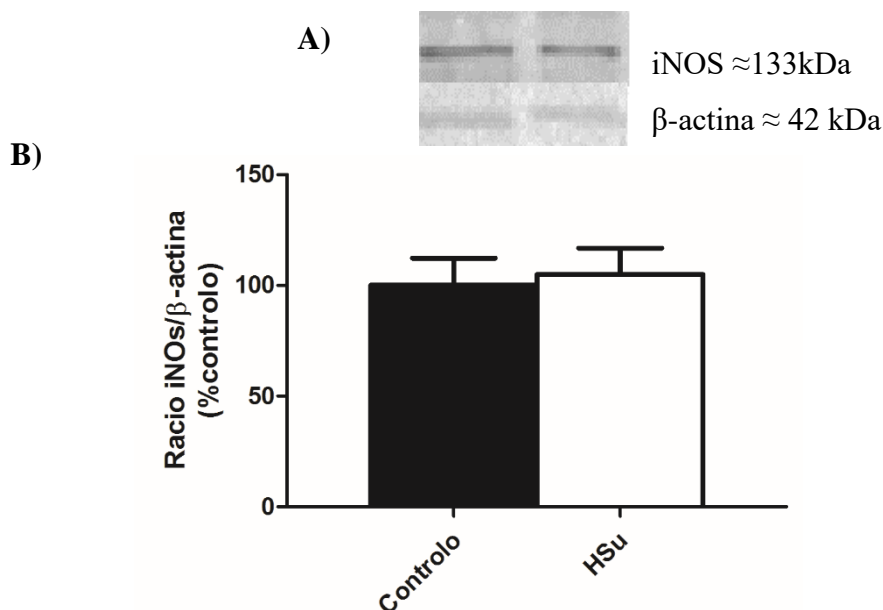


Figura 11- Expressão da iNOS e de β-actina no músculo-esquelético. A) Imagem representativa de Western blots que comparam a expressão da iNOS (133kDa) e β-actina (42kDa) no músculo-esquelético em animais controlo e sujeitos a uma dieta com 35% de sacarose na água (HSu). B) Mostra respetivamente, valores médios da expressão de iNOS (n=16-20) em relação à expressão de β-actina (n=16-20). As barras verticais representam a média ± S.E.M.

Como se observa na figura 11, a dieta HSu não modificou de forma significativa a expressão da iNOS no músculo-esquelético.

Discussão

No presente trabalho demonstrou-se que a dieta HSu altera a produção de NO no fígado e no músculo-esquelético de ratos *Wistar*, mas não no tecido adiposo. Adicionalmente, observou-se que fisiologicamente a adenosina modula a produção de NO em tecidos sensíveis à insulina, no caso o músculo-esquelético e o fígado, via recetores A₁ e A_{2B}, e através de uma ação nos A_{2A} e A_{2B} no tecido adiposo. Mais ainda, foi pela primeira vez demonstrado que o aumento da produção de NO no fígado em animais de NO, é mediado pelo recetor adenosina A_{2A}, e que o aumento na produção de NO no músculo-esquelético é abolido pelos agonistas dos recetores de adenosina do subtipo A₂.

O NO pode ser medido através de diversos métodos (diretos e indiretos), como a cromatografia de fase líquida ou gasosa, espectrometria de massa, espectrofotometria, espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica e métodos eletroquímicos. No entanto, o seu tempo de semivida curto e as baixas concentrações de NO *in vivo* condicionam

gravemente a sua quantificação. Estas dificuldades podem, porém, ser eliminadas medindo os seus metabolitos estáveis (NO_x), em particular o nitrito e o nitrato.^{94,95,96} Com métodos indiretos tem-se, então, a possibilidade de calcular o NO_x por HPLC (reação de Greiss) e/ou métodos de quimioluminescência, sendo estes bons indicadores da produção endógena de NO e permitindo, assim, avaliar a atividade da NOS. A quimioluminescência em fase gasosa entre o NO e o ozono (O_3) é amplamente reconhecida como a mais precisa e sensível técnica para medição de NO.⁹⁷ Neste caso, usou-se o NOA, modelo 280TM, que é um detetor de elevada sensibilidade e que permite a determinação do NO baseada na reação ocorrida entre a amostra biológica, o VCl_3 e o HCl quando sujeitos a temperaturas $\geq 90^\circ\text{C}$.

Vários foram os autores que já quantificaram as concentrações plasmáticas de nitritos/nitratos.^{98,99,100,101} Sobre tecidos existem apenas alguns estudos, por exemplo Piknova, que quantificou a concentração de nitratos em tecidos homogeneizados (fígado e músculo-esquelético) de ratos *Wistar*, através do método de quimioluminescência tri-iodeto/cloreto de vanádio e verificou que a concentração de nitratos no músculo-esquelético (212.4 ± 52.1 nmol/g tecido) é significativamente maior que a presente no fígado (12.7 ± 4.6 nmol/g tecido).¹⁰² Já Rodriguez, J., assumindo uma distribuição homogênea ao longo do endotélio e da musculatura lisa, descreveu, através de análise por HPLC, que a concentração de nitratos nos homogeneizados era de $42 \pm 7 \mu\text{M}$, enquanto a concentração de nitritos era de $10 \pm 1 \mu\text{M}$ (ver referencia de Hall, Catherine e Garthwaite, John, para quantificações noutros tecidos)^{103,36} Tal como os resultados apresentados por Picknova, a concentração de nitratos no músculo-esquelético no presente trabalho foi também significativamente maior que a presente no fígado, se bem que ligeiramente menor, talvez devido ao tipo de músculo extraído (neste caso músculo *soleus*, não tendo sido especificado o seu tipo na referência citada).

Enquanto parece haver um consenso relativamente à diminuição da bioatividade de NO na diabetes, o mesmo parece não acontecer nas alterações da produção do mesmo. Vários estudos sugerem que há um aumento basal nos níveis de NO plasmático em doentes com T2D.^{104,95,105} E de facto, o mesmo foi observado no nosso laboratório, em modelos animais de insulinoresistência (Conde e colaboradores, 2012).¹⁰⁶ Maejima e colaboradores (2001) sugeriram que este aumento se deve a um fenómeno compensatório da diminuição das respostas vasculares a vários agentes vasoativadores intrínsecos.⁹⁵ Já Ki e colaboradores (1999) postularam que o aumento da síntese de NO em ratos diabéticos se deve ao aumento da expressão da NOS.¹⁰⁵ Por outro lado, sabe-se que em modelos animais obesos e com IR há diminuição da biodisponibilidade de NO.^{107,108} Talvez devido há diminuição da expressão da NOS, à sua ineficaz atividade, ou à reação de NO com espécies reativas (por exemplo,

superóxido).¹⁰⁹ Krause e colaboradores (2012) sugerem que os níveis de NO séricos são menores em obesos T2D, quando comparados com indivíduos controle e que, por outro lado, os não obesos apresentam maiores concentrações de NO, o que parece estar associado à quantidade de massa adiposa (menor adiposidade foi associada à produção normal de NO), sugerindo então que menor adiposidade (e mais adiponectina) em T2D não-obesos poderá ser responsável por níveis diferenciais de produção de NO e resistência à insulina.²⁴ Rodriguez e colaboradores (2013) sugerem que, em indivíduos com T2D, a diminuição observada da produção de NO é resultado da diminuição da estimulação da insulina pela fosforilação da nNOS, e que níveis menores de fosfo-nNOS resultam na diminuição da atividade da nNOS, que pode contribuir para a diminuição da captação de glucose induzida pelo NO.¹¹⁰

Quando se comparou o modelo de ratos com a dieta HSu, com o da dieta *standard*, sem qualquer tipo de incubação, e contrariamente ao esperado, observou-se uma diminuição da produção de NO no fígado e no músculo-esquelético de animais sujeitos à dieta HSu, indo de encontro a alguns estudos que demonstraram que a indução da resistência à insulina em animais, provoca a diminuição da eNOS. Poderá também estar a ocorrer uma diminuição da NOS, que se traduz então numa diminuição da biodisponibilidade de NO. Tessari e colaboradores (2010) observaram também no seu estudo que, ao contrário da maioria dos estudos, os seus pacientes com T2D também não tinham sinais de inflamação e, mais ainda, que havia diminuição da síntese de NO. Associaram essas diferenças às características particulares/específicas de cada doente.¹¹¹

Por outro lado, e conforme seria de esperar, observou-se que tecidos de animais sujeitos à dieta HSu e incubados em meio de *tyrode* bicarbonato durante 10, 30 e 60 minutos, parecem aumentar a produção de NO de forma significativa. Assim, e apesar do resultado contraditório relativamente aos tecidos sem incubação, pode postular-se que o aumento da produção de NO se relaciona com o aumento da iNOS, isto porque a iNOS gera 100 a 1000 vezes mais NO do que a eNOS, é expressa em resposta a estímulos imunológicos e a sua atividade persiste durante muitas horas. Desta forma, o aumento da produção de NO no fígado e no músculo-esquelético, pode dever-se ao aumento da produção de iNOS.^{112,113} Por outro lado, estudos prévios já retratam a importância desta isoforma na regulação da resistência à insulina no fígado e músculo-esquelético e esta parece ter um papel muito importante na resposta inflamatória em múltiplos tecidos, mais notavelmente, no tecido adiposo.^{109,113} A compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a via da iNOS em condições normais e hiperglicémicas, ajudaria a explicar algumas das alterações vasculares observadas na T2D. No presente trabalho, não foi observada qualquer alteração na expressão da iNOS, quer no

fígado, quer no músculo-esquelético. No entanto, não é possível excluir que o aumento aqui observado de produção de NO no fígado, não se deva a um aumento da sua atividade.

Tal como descrito na introdução e discutido na discussão deste mesmo trabalho, a quantificação de NO já foi previamente descrita em alguns tecidos. Outros estudos, no entanto, não associam a produção de NO em tecidos sensíveis à insulina, com os efeitos de adenosina. Como tal, este é o primeiro estudo que descreve que a adenosina é capaz de modular a produção de NO em tecidos sensíveis à insulina, nomeadamente no fígado, músculo-esquelético soleus e tecido adiposo.

Antes de iniciar a discussão relativa ao envolvimento dos recetores de adenosina na produção de NO, gostaria de salientar que as concentrações dos diferentes agonistas utilizadas estão referidas na literatura como sendo específicas para estes mesmos recetores (www.iuphar.org - recetor database).

É consensual que no tecido adiposo, o antagonismo dos recetores A₁ de adenosina estimula a lipólise e conduz à IR.¹¹⁴ No entanto e embora o papel dos A₁ no músculo-esquelético ser bastante controverso, este foi desde sempre o recetor de adenosina apontado como estando envolvido na sensibilidade/resistência à insulina. Relativamente aos recetores A_{2B}, Figler e colaboradores (2011) observaram que ratinhos knockout para estes recetores e submetidos a dietas hipercalóricas apresentavam uma diminuição nos níveis de glucose e na sensibilidade à insulina quando comparados com ratinhos insulino-resistentes. Os mesmos autores postularam que o aumento da IR deve-se em parte à elevação dos mediadores inflamatórios via recetores A_{2B}.¹¹⁵ Por outro lado, Patel (2014) ao administrar um antagonista dos recetores A_{2B} aumentou os níveis de NO no rim sugerindo que a relação entre a adenosina e o NO no rim é mediada via A_{2B}.¹¹⁶ Os resultados aqui descritos nesta tese estão então de acordo com os descritos anteriormente e também com o recente trabalho de Sacramento e colaboradores que viram que os recetores A₁ e A_{2B} modulavam a sensibilidade à insulina.⁵⁹ A partir dos resultados aqui apresentados podemos sugerir então que este efeito pode ser mediado pelo NO.

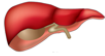


No entanto, nos animais HSu observou-se uma alteração nas interações entre a adenosina e o NO estando a interação A₁-NO e A_{2B} no fígado e a A₁-NO no músculo-esquelético inibidas, dando isto lugar à predominância da interação entre o recetor A_{2A} e o NO em ambos os tecidos. De facto a visualização da facilitação da libertação e produção de mediadores pelos recetores A_{2A}, apenas quando os A₁ estão inibidos, não é novidade, uma vez que tal já foi observado nos plexos mesentéricos e no diafragma.^{117,118}

A presença e ação de recetores A_{2A} no fígado e no músculo-esquelético já foi descrita

anteriormente.^{80,59} No entanto, embora a função destes esteja definida no fígado, aumentando a taxa da glicogenólise, a função destes no músculo-esquelético não se encontra definida. De facto, o efeito dos receptores A_{2A} quer na produção de NO no fígado quer como indutores da taxa de glicólise no fígado coaduna-se com o que foi descrito por Hodis e colaboradores em 2007, que viram que a glicogenólise envolvia a estimulação dos receptores e a produção de NO.¹¹⁹ No presente trabalho, observou-se também que nos animais Hsu a interação entre os recetores A_{2A} e o NO no fígado parece estar associada a um aumento da produção de NO enquanto que no músculo-esquelético parece estar associada a uma diminuição da produção de NO. Quanto à interação recetores A_{2A} -NO no músculo-esquelético descrita no presente trabalho, observou-se que a ativação dos recetores A_{2A} promove a diminuição da produção de NO neste tecido. Com base nestes resultados e no facto de estar descrito que a insulinoresistência está associada à disfunção das células endoteliais no músculo-esquelético e como tal à diminuição dos níveis de NO neste tecido,¹²⁰ podemos sugerir que provavelmente a interação que observámos neste tecido entre os recetores A_{2A} e o NO está presente nas células endoteliais. Por outro lado, no tecido adiposo, observou-se a perda da interação A_{2A} -NO nos animais insulinoresistentes. Sabendo que está descrito que a adenosina via recetores A_{2A} possui um papel importante na ativação do tecido adiposo castanho e na proteção contra a obesidade e dado que a obesidade é um dos principais fatores desencadeadores da insulinoresistência poderíamos sugerir que para este efeito contribuiria o NO.⁷⁶ Para além disso poderíamos sugerir que a ausência desta interação pode estar na base do desenvolvimento de insulinoresistência nos animais HSu.

Em suma, em animais controlo os recetores A_1 correlacionam-se com o aumento da produção do NO no fígado e no músculo-esquelético, já os recetores A_{2B} por seu lado parecem ter um efeito inibitório na produção do NO em todos os tecidos estudados. No que concerne aos A_{2aA} este parece aumentar a produção do NO no tecido adiposo. Relativamente ao modelo de ratos com dieta HSu podemos verificar que os recetores A_1 perdem o seu efeito neste estado mas por outro lados os A_{2A} ganham mais importância, o efeito dos A_{2B} por sua vez é mantido exceto no caso do fígado (ver tabela 2).

Tabela 4- Efeito do agonismo dos recetores de adenosina na produção de óxido nítrico nos tecidos sensíveis à insulina, fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo em animais controlo e em animais submetidos a uma dieta rica em sacarose (HSu)

NO production	Control			HSu		
	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₁	A _{2A}	A _{2B}
	↑		↓		↑	
	↑		↓		↓	↓
		↑	↓			↓

Conclusão

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, é possível afirmar pela primeira vez que, em condições fisiológicas, a adenosina modula a produção de NO nos tecidos sensíveis à insulina, por uma ação dos recetores A₁ e A_{2B} no músculo-esquelético e no fígado, e através de uma ação A_{2A} e A_{2B} no tecido adiposo. Foi também demonstrado que, nos animais insulinoresistentes, a produção de NO aumenta no fígado e no músculo-esquelético, via recetores A_{2A} de adenosina. Adicionalmente, foi demonstrado que a produção de NO no tecido adiposo não se encontra em condições de insulinoresistência. Conclui-se, então, que alterações na interação entre os recetores de adenosina e o NO no músculo-esquelético e no fígado podem contribuir para o desenvolvimento de insulinoresistência nestes tecidos.

Porém, para uma total clarificação dos resultados obtidos com a incubação dos diferentes agonistas dos recetores de adenosina, ter-se-ão de realizar estudos quer de expressão dos diferentes subtipos de recetores de adenosina nos respetivos tecidos, quer também testar antagonistas dos mesmos recetores e verificar se há, então, alteração na produção de NO. Para além disso, será importante averiguar se a própria adenosina poderia alterar a atividade da iNOs.

Trabalhos futuros

Este trabalho teve como propósito a realização do trabalho experimental conducente à Dissertação referente ao 2º ano do Mestrado em Biologia Molecular e Genética da Faculdade

de Ciências da Universidade de Lisboa, no entanto, e dado que um ano é um período de tempo curto para a aprendizagem de novas técnicas e obtenção de resultados, ficaram por realizar e aprofundar várias questões que serão nesta secção abordadas como trabalhos futuros. O primeiro ponto destes trabalhos futuros refere-se ao teste de outras concentrações dos diferentes agonistas dos recetores de adenosina, de modo a construir uma curva dose-resposta, e assim fazer um estudo farmacológico completo. Adicionalmente, ter-se-á de estudar o papel do recetor A₃ na produção de NO, uma vez que isso não foi focado no presente trabalho. Para além disso, de maneira a confirmar o efeito dos diferentes recetores, ter-se-ão de testar os antagonistas dos diferentes recetores na presença dos agonistas, averiguando se de facto é possível bloquear o efeito destes últimos.

O segundo ponto destes trabalhos futuros refere-se ao aumento do número de experiências, visto que o número de animais utilizado em alguns grupos é baixo e, assim, o erro existente em alguns grupos é relativamente elevado. De igual forma, pretende-se quantificar a libertação de NO para o meio extracelular e não só a sua produção intrínseca.

Por outro lado seria interessante estudar também a interação entre a adenosina e o NO num modelo de diabetes tipo 2.

1. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005;365(9467):1333-1346. doi:10.1016/S0140-6736(05)61032-X.
2. Organization WH. Screening for Type 2 Diabetes Screening for Type 2 Diabetes.
3. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(2):137-149. doi:10.1016/j.diabres.2013.11.002.
4. Gardete-Correia L, Boavida JM, Raposo JF, et al. First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabet Med*. 2010;27(8):879-881. doi:10.1111/j.1464-5491.2010.03017.x.
5. Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. *Nutrition*. 1997;13(1):65; discussion 64, 66. doi:S0899900797806375.
6. Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med*. 2005;56(3):45-62. doi:10.1146/annurev.med.56.082103.104751.
7. Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson M a., Ronald Kahn C. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic β cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*. 1999;96(3):329-339. doi:10.1016/S0092-8674(00)80546-2.
8. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2012;35(6):1364-1379. doi:10.2337/dc12-0413.
9. Kashyap, S. DeFronzo R. The insulin resistance syndrome. *Compr Ther*. 1997;23(4):237-243.
10. Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res*. 2005;36(3):197-209. doi:10.1016/j.arcmed.2005.01.003.
11. Bays H, Mandarino L, DeFronzo R a. Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):463-478. doi:10.1210/jc.2003-030723.
12. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: Time for a critical appraisal - Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*. 2005;48(9):1684-1699. doi:10.1007/s00125-005-1876-2.
13. DeFronzo R, Ferrannini E. Insulin resistance. *Diabetes Care*. 1991;14(3):173-194.
14. Hu F et al. Diet, Lifestyle, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. *The New England Journal of medicin*. 2001;345(11):790-797.
15. Tuomilehto J., Indstrom J., Eriksson J., Valle T. HE& UM. Numb Er 18 Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus By Changes in Lifestyle Among Subjects With Impaired Glucose Tolerance. *N Engl J Med*. 2001;344(18):1343-1350.
16. Tabák A et al. Prediabetes : A high-risk state for developing diabetes. 2014;379(9833):1-19. doi:10.1016/S0140-6736(12)60283-9.Prediabetes.
17. Gulcher J, Stefansson K. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2009;360(13):1360; author reply 1361.
18. Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs*. 2002;16(2):17-23.
19. Legro RS, Kunselman a R, Dodson WC, Dunaif a. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(1):165-169. doi:10.1210/jcem.84.1.5393.
20. Kennedy L. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: followup of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Yearb Med*. 2007;2007:531-532. doi:10.1016/S0084-3873(08)70310-9.
21. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. International Diabetes Federation: A consensus on Type 2 diabetes prevention. *Diabet Med*. 2007;24(5):451-463. doi:10.1111/j.1464-5491.2007.02157.x.

22. Endemann DH, Schiffrin EL. Nitric oxide, oxidative excess, and vascular complications of diabetes mellitus. *Curr Hypertens Rep.* 2004;6(2):85-89. doi:10.1007/s11906-004-0081-x.
23. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson a, Fineberg N, Baron a D. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest.* 1994;94(3):1172-1179. doi:10.1172/JCI117433.
24. Krause M, Rodrigues-Krause J, O'Hagan C, et al. Differential nitric oxide levels in the blood and skeletal muscle of type 2 diabetic subjects may be consequence of adiposity: A preliminary study. *Metabolism.* 2012;61(11):1528-1537. doi:10.1016/j.metabol.2012.05.003.
25. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(2):156-167. doi:10.1038/nrd2466-c2.
26. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AMG. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(10):766-775. doi:10.1038/nrn2214.
27. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15(1):323-350. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.323.
28. Bahadoran Z, Ghasemi A, Mirmiran P, Azizi F, Hadaegh F. Beneficial effects of inorganic nitrate/nitrite in type 2 diabetes and its complications. *Nutr Metab (Lond).* 2015;12(1):1-9. doi:10.1186/s12986-015-0013-6.
29. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* 1993;7:349-360.
30. Snyder S, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 1992;266(5):28-35.
31. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.* 1999;31(6):577-596. doi:10.1080/10715769900301161.
32. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271(73):C1424-C1437.
33. Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med.* 1995;1(8):804-809.
34. Ghasemi A, Zahediasl S. Is nitric oxide a hormone? *Iran Biomed J.* 2011;15(3):59-65.
35. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, et al. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest.* 2002;109(9):1241-1248. doi:10.1172/JCI200214995.
36. Rodriguez J, Maloney RE, Rassaf T, Bryan NS, Feelisch M. Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(1):336-341. doi:10.1073/pnas.0234600100.
37. King GL, Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(4):333-338. doi:10.1007/s00418-004-0678-9.
38. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(December):813-820. doi:10.1038/414813a.
39. Dawson TEDM, Dawson VL. Nitric Oxide : Actions and. 1995;1(1):7-18.
40. Jensen FB. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2009;1787(7):841-848. doi:10.1016/j.bbabi.2009.02.010.
41. Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(4):697-705. doi:10.1161/01.ATV.0000204350.44226.9a.
42. Baek KJ, Thiel B a., Lucas S, Stuehr DJ. Macrophage nitric oxide synthase subunits: Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem.* 1993;268(28):21120-21129.
43. Stevens-Truss R, Beckingham K, Marletta M a. Calcium binding sites of calmodulin and electron transfer by neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry.* 1997;36(40):12337-12345. doi:10.1021/bi970973k.
44. Bredt D, Hwang PM, Glatt CE, et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 1991;351(6329):714-718.
45. Griffith, O. Stuehr D. Nitric oxide synthases. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:707-736.
46. Ghosh DSJ. Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front Biosci.* 2003;8:193-209. doi:10.2741/959.

47. Higashino H et al. Serum Nitric Oxide Metabolite Levels in Groups of Patients with Various Diseases in Comparison of Healthy Control Subjects. *J Med Sci.* 2010;10(1):1-11. <http://scialert.net/abstract/?doi=jms.2010.1.11>.
48. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignatola O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2006;15(4):265-279. doi:10.1016/j.niox.2006.03.011.
49. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. 2008;294(January). doi:10.1152/ajprenal.00424.2007.
50. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(2):19-39.
51. Sydow K, Mondon CE, Cooke JP. Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA. *Vasc Med.* 2005;10 Suppl 1:S35-S43. doi:10.1191/1358863x05vm604oa.
52. Ross RM, Wadley GD, Clark MG, Rattigan S, McConell GK. Muscle Glucose Uptake but Not Capillary Blood Flow During In Situ Muscle Contraction in Rats. *Diabetes.* 2007;56(December):2885-2892. doi:10.2337/db07-0745.
53. Lin KY, Ito A, Asagami T, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: Role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 2002;106(8):987-992. doi:10.1161/01.CIR.0000027109.14149.67.
54. Balon T, Nadler J. *Rapid Communication.* Vol 134. 1997. doi:10.1017/S0016756897007061.
55. Bradley SJ, Kingwell B a, McConell GK. Nitric oxide synthase inhibition reduces leg glucose uptake but not blood flow during dynamic exercise in humans. *Diabetes.* 1999;48(9):1815-1821. doi:10.2337/diabetes.48.9.1815.
56. Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, et al. Adenosine Receptor Signaling In Vitro and In Vivo. 2001;282:274-282.
57. Conde S, Monteiro E, Obeso A, Gonzalez C. Adenosine in Peripheral Chemoreception: New Insights into a Historically Overlooked Molecule. *Arter Chemorecept.* 2009:159-174. doi:10.1007/978-90-481-2259-2.
58. Poulsen S a, Quinn RJ. Adenosine receptors: new opportunities for future drugs. *Bioorg Med Chem.* 1998;6(6):619-641. doi:10.1016/S0968-0896(98)00038-8.
59. Sacramento JF, Ribeiro MJ, Yubero S, et al. Disclosing caffeine action on insulin sensitivity: Effects on rat skeletal muscle. *Eur J Pharm Sci.* 2015;(February). doi:10.1016/j.ejps.2015.01.011.
60. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig a, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999;51(1):83-133. doi:0031-6997/99/5101-0083\$03.00/0.
61. Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 2001;79(3):463-484. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00607.x.
62. Koupenova M, Ravid K. Adenosine, adenosine receptors and their role in glucose homeostasis and lipid metabolism. *J Cell Physiol.* 2013;(February). doi:10.1002/jcp.24352.
63. Arch JR, Newsholme E a. Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. *Biochem J.* 1978;174(3):965-977.
64. Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedeberts Arch Pharmacol.* 2000;362(4-5):364-374. doi:10.1007/s002100000313.
65. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(9):759-770. doi:10.1038/nrd2638.
66. Liang B, Urso M, Zambraski E, Jacobson K. A3 Adenosine Receptors in Muscle Protection. In: *Adenosine Receptors from Cell Biology to Pharmacology.* Vol ; 2010:61-73. doi:10.1007/978-90-481-3144-0.
67. Corssmit EP, Romijn J a, Endert E, Sauerwein HP. Pentoxifylline inhibits basal glucose production in humans. *J Appl Physiol.* 1994;77(6):2767-2772.

68. Rüsing D, Müller CE, Verspohl EJ. The impact of adenosine and A(2B) receptors on glucose homeostasis. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(12):1639-1645. doi:10.1211/jpp.58.12.0011.
69. Arias a MP, Bisschop PH, Ackermans MT, et al. Aminophylline stimulates insulin secretion in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metab Exp*. 2001;50(9):1030-1035. doi:10.1053/meta.2001.25800.
70. Budohoski L, Challiss R a J, Lozeman FJ, Mcmanus B, Newsholme E a. Increased insulin sensitivity in soleus muscle from cold-exposed rats : reversal by an adenosine receptor agonist. *October*. 1984;175(2):402-406.
71. Thong F, Graham T. The Putative Roles of Adenosine in Insulin- and Exercise-Mediated Regulation of Glucose Transport and Glycogen Metabolism in Skeletal Muscle. *Can J Appl Physiol*. 2002;27(2):152-178.
72. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Basic and Clinical Pharmacology*. Vol 12^a ed. Mc Graw Hill; 2012.
73. Obiefuna PCM, Batra VK, Nadeem a, Borron P, Wilson CN, Mustafa SJ. A Novel A 1 Adenosine Receptor Antagonist , L-97-1 [3- [2- (4- Allergic Responses to House Dust Mite in an Allergic Rabbit Model of Asthma. *Pharmacology*. 2005;315(1):329-336. doi:10.1124/jpet.105.088179.creatively.
74. Jacobson K a, Gao Z-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(3):247-264. doi:10.1038/nrd1983.
75. Bosch MP, Campos F, Niubó I, et al. Synthesis and biological activity of new potential agonists for the human adenosine A2A receptor. *J Med Chem*. 2004;47(16):4041-4053. doi:10.1021/jm031143+.
76. Gnad T, Scheibler S, von Kügelgen I, et al. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature*. 2014. doi:10.1038/nature13816.
77. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ*. 2007;14(7):1315-1323. doi:10.1038/sj.cdd.4402132.
78. Jarvis MF, Schulz R, Hutchison a J, Do UH, Sills M a, Williams M. [3H]CGS 21680, a selective A2 adenosine receptor agonist directly labels A2 receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;251(3):888-893.
79. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*. 2004;25(1):33-39. doi:10.1016/j.it.2003.11.003.
80. Antonioli L, Blandizzi C, Csóka B, Pacher P, Haskó G. Adenosine signalling in diabetes mellitus—pathophysiology and therapeutic considerations. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;1-14. doi:10.1038/nrendo.2015.10.
81. Mortensen SP, Nyberg M, Thaning P, Saltin B, Hellsten Y. Adenosine contributes to blood flow regulation in the exercising human leg by increasing prostaglandin and nitric oxide formation. *Hypertension*. 2009;53(6):993-999.
82. Skinner MR, Marshall JM. Studies on the roles of ATP, adenosine and nitric oxide in mediating muscle vasodilatation induced in the rat by acute systemic hypoxia. *J Physiol*. 1996;495 (Pt 2):553-560.
83. Ray CJ, Abbas MR, Coney a. M, Marshall JM. Interactions of adenosine, prostaglandins and nitric oxide in hypoxia-induced vasodilatation: in vivo and in vitro studies. *J Physiol*. 2002;544(1):195-209. doi:10.1113/jphysiol.2002.023440.
84. Coney a. M, Marshall JM. Role of adenosine and its receptors in the vasodilatation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia. *J Physiol*. 1998;509(2):507-518. doi:10.1111/j.1469-7793.1998.507bn.x.
85. Franco M, Tapia E, Martínez F, et al. Adenosine regulates renal nitric oxide production in hypothyroid rats. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(8):1681-1688.
86. Ossawald H. Adenosine and renal function. 1983:399-415.
87. Li J, Fenton R a, Ph D, et al. Adenosine A 2a Receptors Increase Arterial Endothelial Cell Nitric Oxide. 1998;364:357-364.
88. Ray CJ, Marshall JM. The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. *J Physiol*. 2006;570:85-96. doi:10.1113/jphysiol.2005.099390.

89. Hein TW, Yuan Z, Rosa RH, Kuo L. Requisite roles of A2A receptors, nitric oxide, and K ATP channels in retinal arteriolar dilation in response to adenosine. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(6):2113-2119. doi:10.1167/iovs.04-1438.
90. Peralta C, Hotter G, Closa D, et al. The Protective Role of Adenosine in Inducing Nitric Oxide Synthesis in Rat Liver Ischemia Preconditioning Is Mediated by Activation of Adenosine A 2 Receptors. *Hepatology*. 1999;1:126-132.
91. Ikeda U, Kurosaki K, Ohya K, Shimada K. Adenosine stimulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 1997;35(1):168-174.
92. Olanrewaju H a, Mustafa SJ. Adenosine A(2A) and A(2B) receptors mediated nitric oxide production in coronary artery endothelial cells. *Gen Pharmacol*. 2000;35(3):171-177. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744240>.
93. Nyberg M, Mortensen SP, Thaning P, Saltin B, Hellsten Y. Interstitial and plasma adenosine stimulate nitric oxide and prostacyclin formation in human skeletal muscle. *Hypertension*. 2010;56(6):1102-1108.
94. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A Rapid , Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. 2001;5(1):62-71. doi:10.1006/niox.2000.0319.
95. Maejima K, Nakano S, Himeno M, et al. Increased basal levels of plasma nitric oxide in Type 2 diabetic subjects. *J Diabetes Complications*. 2001;15(3):135-143. doi:10.1016/S1056-8727(01)00144-1.
96. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem*. 1995;41(6):892-896.
97. Pinder AG, Rogers SC, Khalatbari A, Ingram TE, James PE. The measurement of nitric oxide and its metabolites in biological samples by ozone-based chemiluminescence. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 476. ; 2008:11-28. doi:10.1007/978-1-59745-129-1_2.
98. Faassen EE Van, Bahrami S, Feelisch M, et al. Nitrite as Regulator of Hypoxic Signaling in Mammalian Physiology. 2009;29(5). doi:10.1002/med.
99. Hall CN, Garthwaite J. Nitric Oxide What is the real physiological NO concentration in vivo ? 2009;21(2):92-103. doi:10.1016/j.niox.2009.07.002.
100. Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in pediatrics. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2010;23(4):264-268. doi:10.1016/j.niox.2010.07.007.
101. Ramu A, Susheel N, Pankaj B, et al. Hyperglycaemia Enhances Nitric Oxide Production in Diabetes: A study from Indian Patients. 2015;(496):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0125270.
102. Piknova B, Park JW, Swanson KM, et al. Skeletal muscle as an endogenous nitrate reservoir. *Nitric Oxide*. 2015. doi:10.1016/j.niox.2015.02.145.
103. Hall CN, Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide*. 2009;21(2):92-103. doi:10.1016/j.niox.2009.07.002.
104. Özden S, Tathpinar S, Bigçer N, et al. Basal serum nitric oxide levels in patients with type 2 diabetes mellitus and different stages of retinopathy. *Can J Ophthalmol / J Can d'Ophthalmologie*. 2003;38(5):393-396. doi:10.1016/S0008-4182(03)80051-0.
105. Ch K, Kim H, D M, Toz ST. Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy in Streptozotocin - Induced Diabetic Rats. *Korean J Intern Med* .1999;14(1).
106. Conde S V., Nunes da Silva T, Gonzalez C, Mota Carmo M, Monteiro EC, Guarino MP. Chronic caffeine intake decreases circulating catecholamines and prevents diet-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Br J Nutr*. 2012;107(01):86-95. doi:10.1017/S0007114511002406.
107. Bender SB, Herrick EK, Lott ND, Klabunde RE. Diet-induced obesity and diabetes reduce coronary responses to nitric oxide due to reduced bioavailability in isolated mouse hearts. *Diabetes, Obes Metab*. 2007;9(5):688-696. doi:10.1111/j.1463-1326.2006.00650.x.
108. Kim F, Pham M, Maloney E, et al. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(11):1982-1988. doi:10.1161/ATVBAHA.108.169722.
109. Sansbury BE, Hill BG. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2014;73C:383-399. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.016.
110. Hinchee-rodriguez K, Garg N, Venkatakrishnan P, et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Neuronal nitric oxide synthase is phosphorylated in response to

- insulin stimulation in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;435(3):501-505. doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.020.
111. Tessari P, Cecchet D, Cosma A, et al. Nitric Oxide Synthesis Is Reduced in Subjects With. 2010;59(September). doi:10.2337/db09-1772.
 112. Morris SM, Billiar R, Sidney M. New insights into the regulation nitric oxide synthesis of inducible. 1994.
 113. Soskić SS, Dobutović BD, Sudar EM, et al. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and its Potential Role in Insulin Resistance, Diabetes and Heart Failure. *Open Cardiovasc Med J*. 2011;5(September 2015):153-163. doi:10.2174/1874192401105010153.
 114. Xu B, Berkich D a, Crist GH, LaNoue KF. A1 adenosine receptor antagonism improves glucose tolerance in Zucker rats. *Am J Physiol*. 1998;274(2 Pt 1):E271-E279.
 115. Figler R a., Wang G, Srinivasan S, et al. Links between Insulin resistance, adenosine A2B receptors, and inflammatory markers in mice and humans. *Diabetes*. 2011;60(2):669-679. doi:10.2337/db10-1070.
 116. Patel L, Thaker A. The effects of adenosine A2B receptor inhibition on VEGF and nitric oxide axis-mediated renal function in diabetic nephropathy. *Ren Fail*. 2014;6049:1-9. doi:10.3109/0886022X.2014.900404.
 117. Duarte-Araújo M, Nascimento C, Alexandrina Timóteo M, Magalhães-Cardoso T, Correia-de-Sá P. Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A(2A) and extrajunctional inhibitory A(1) receptors. *Br J Pharmacol*. 2004;141(6):925-934. doi:10.1038/sj.bjp.0705697.
 118. Correia-de-Sá P, Timóteo MA RJ. Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J Neurophysiol*. 1996;76(6):3910-3919.
 119. Hodis J, Kutinová-Canová N, Potmesil P, et al. The role of adrenergic agonists on glycogenolysis in rat hepatocyte cultures and possible involvement of NO. *Physiol Res*. 2007;56(4):419-425. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16925470>.
 120. Hariya N, Mochizuki K, Inoue S, et al. Insulin Resistance in SHR/NDmc-cp Rats Correlates with Enlarged Perivascular Adipocytes and Endothelial Cell Dysfunction in Skeletal Muscle. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2014;60(1):52-59. doi:10.3177/jnsv.60.52.
 121. DeFronzo R a. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 2004;88(4):787-835, ix. doi:10.1016/j.mcna.2004.04.013.
 122. Turner RC, Cull C a, Frighi V, Holman RR. Metformin , or Insulin in Patients. *Am Med Assoc*. 2005;281(21):2005-2012. doi:doi:10.1001/jama.281.21.2005.

Anexo I

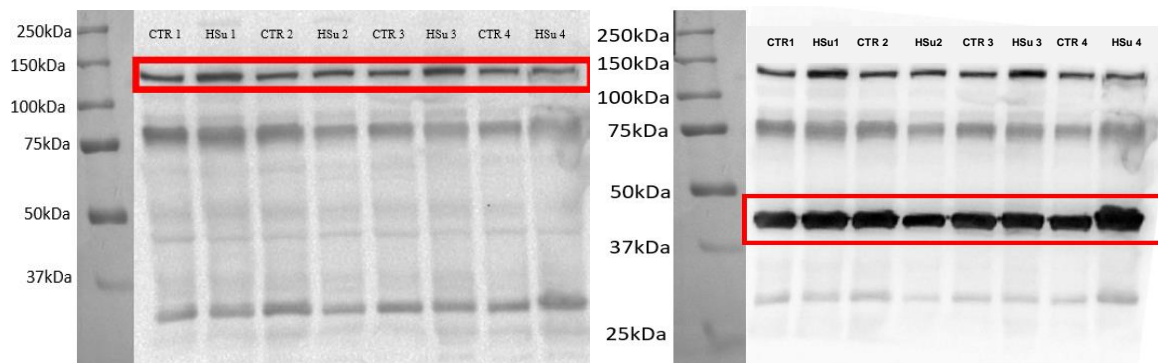


Figura 12 - **Expressão da iNOS e de β-actina no fígado.** Imagem completa de um gel representativo dos Western blots realizados em que se compara a expressão da A) iNOS (133kDa) e da B) β-actina (42kDa) no fígado em animais controle e sujeitos a uma dieta com 35% de sacarose na água (HSu).

Anexo II

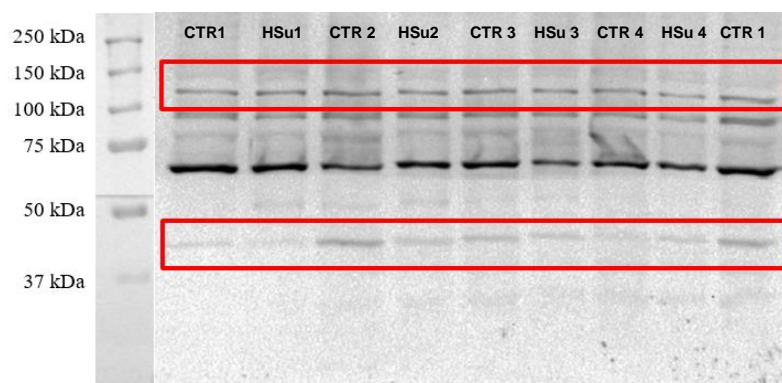


Figura 13- **Expressão da iNOS e de β-actina no músculo-esquelético.** Imagem completa de um gel representativo dos Western blots realizados em que se compara a expressão da iNOS (133kDa) e da β-actina (42kDa) no músculo-esquelético em animais controle e sujeitos a uma dieta com 35% de sacarose na água (HSu).

Anexo III

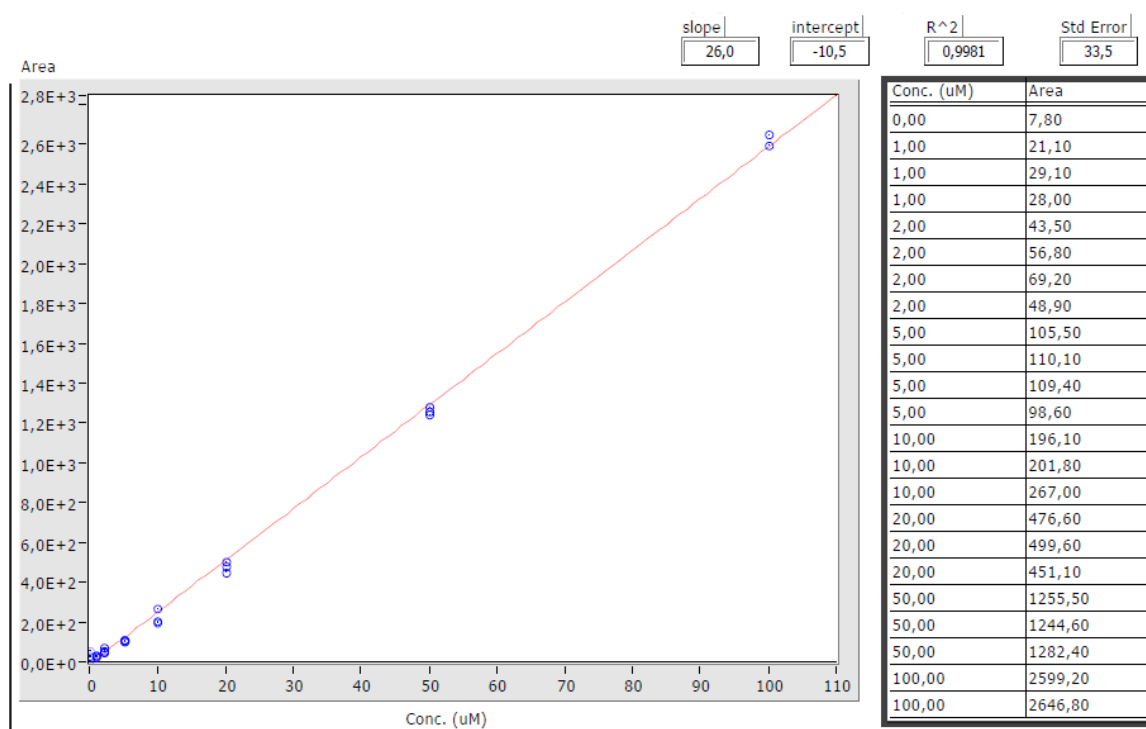
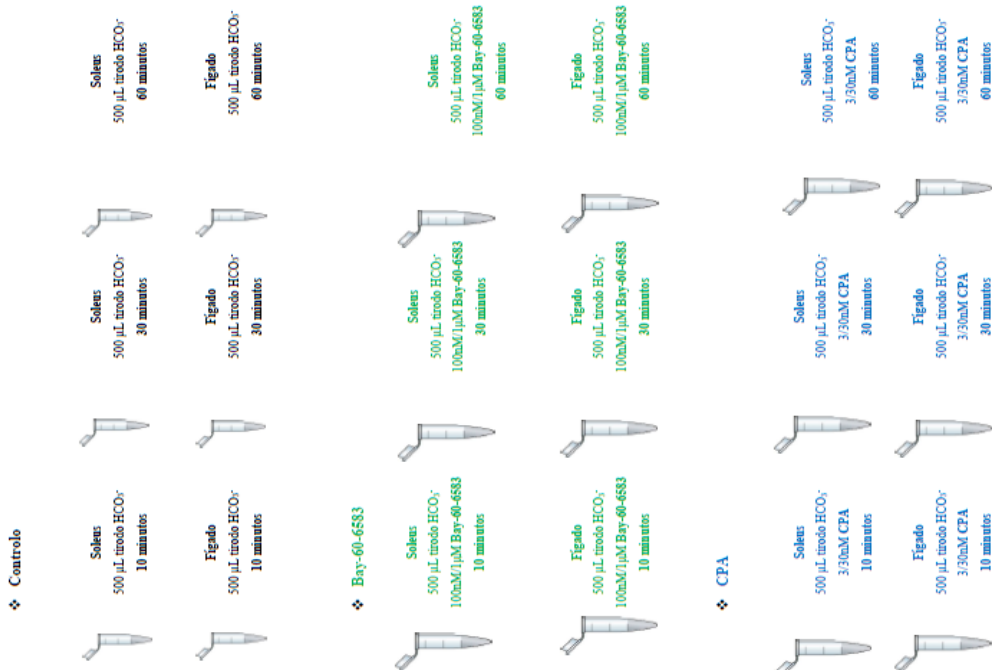
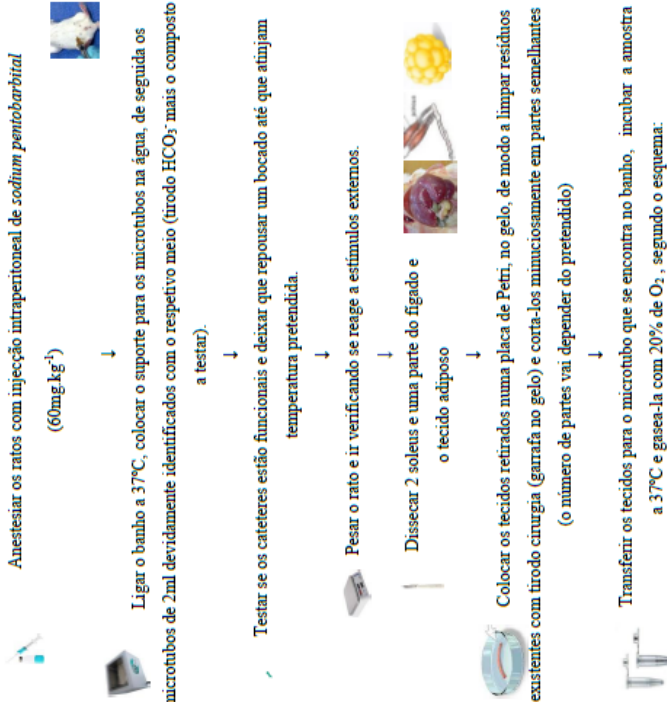


Figura 14-- Curva de calibração de NOA. Exemplo duma curva de clibração obtida pelo programa NOA (Nitric Oxide Analyzer)

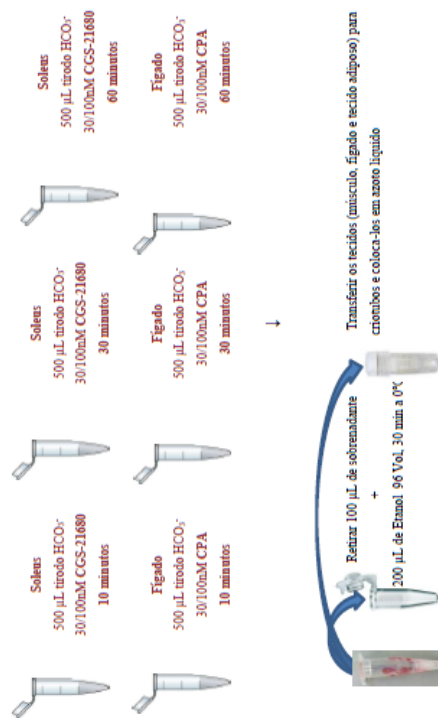
NEURONAL CONTROL OF METABOLIC DISTURBANCES: THERAPEUTIC STRATEGIES

Efeito de agonistas dos receptores da adenosina A₁, A_{2A} e A_{2B} (CPA, CGS-21680 e BAY-60-6583 respetivamente) na produção de óxido nítrico no fígado, músculo-esquelético (soleus) e tecido adiposo

1. Recolha de tecidos



❖ CGS-21680



Nota: Para os tecidos depois é necessário homogeneizar e desproteínizar, no caso dos sobrenadantes procede-se apenas a desproteínização.

2. Homogeneização de tecidos para quantificação de óxido nítrico (NO)

Pesar os tecidos extraídos, transferindo-os para um microtubo de 2ml previamente tarado na balança

Adicionar 300 µL de tampão de homogeneização para o NO para músculo-esquelético ou e 500µL para fígado e tecido adiposo

Homogeneizar os tecidos num homogeneizador automático

Centrifugar 20 minutos a 4°C a 1300g

Transferir o sobrenadante para outro microtubo e guardar a -80°C

3. Desproteínização das amostras

Diluir as amostras 3x (100µL de amostra (sobrenadante) com 200µL de etanol a 96% de volume a 4°C



4. Quantificação de NO no Sievers Nitric Oxide Analyzer (NOA 280i)

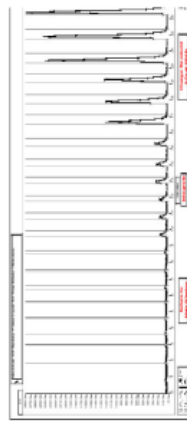
4.1. Ligar o NOA

VACUUM	PUMP	PASS
COOLER	TEMP	PASS
CELL	PRESS	PASS
SUPPLY	PRESS	TESTING
PMT	SIGNAL	
ENT=STATUS	CLR=STOP	

4.2. Fazer solução de nitrato de sódio (NaNO_3) 100mM e sucessivas diluições para a curva padrão.

10mM → 100µl da solução de 100 mM + 900 µl água milliQ
100 µM → 10µl da solução de 10 mM + 990 µl água milliQ
50 µM → 500 µl da solução de 100 µM + 500 µl água milliQ
20 µM → 400 µl da solução de 50 µM + 600 µl água milliQ
10 µM → 500 µl da solução de 20 µM + 500 µl água milliQ
5 µM → 500 µl da solução de 10 µM + 500 µl água milliQ
1 µM → 400 µl da solução de 5 µM + 600 µl água milliQ
1 µM → 500 µl da solução de 2 µM + 500 µl água milliQ

- 4.3. Injetar os padrões
- 4.4. Fazer a curva padrão



- 4.5. Integração dos picos
- 4.6. Injetar amostras, integrar
- 4.7. Registrar os valores de concentração para cada amostra